



EESTI MAAÜLIKOOL
Põllumajandus- ja keskkonnainstituut

Marian Põldmets

**BIOFUNGITSIIDIDE MÕJU RISTÕIELISTE NUUTRI
TÕRJES**
EFFECT OF BIOFUNGICIDES ON CLUBROOT DISEASE

Magistritöö
Aianduse õppekava

Juhendajad: Riinu Kiiker, *PhD*
Kaire Loit, *MSc*

Tartu 2021

Eesti Maaülikool		Magistritöö lühikokkuvõte	
Kreutzwaldi 1, Tartu 51006			
Autor: Marian Põldmets		Õppekava: Aiandus	
Pealkiri: Biofungitsiidide mõju ristõieliste nuutri tõrjes			
Lehekülgi: 50	Jooniseid: 6	Tabeleid: 2	Lisasid: 2
<p>Osakond / Õppetool: Taimetervise õppetool</p> <p>ETIS-e teadusvaldkond ja CERC S-i kood: B390 Taimekasvatus, aiandus, taimekaitsevahendid, taimehaigused</p> <p>Juhendaja(d): Riinu Kiiker, <i>PhD</i>; Kaire Loit, <i>MSc</i></p> <p>Kaitsmiskoht ja -aasta: Eesti Maaülikool, 2021</p>			
<p>Ristõieliste nuuter on majanduslikult oluline taimehaigus, mis kahjustab kõiki ristõielisi kultuure. Haigust põhjustav protist <i>Plasmodiophora brassicae</i> moodustab püsivaid ellujäämisstruktuure ning on mullas võimeline säilima pikki aastaid. Efektiiwsed tõrjemeetodid on piiratud. Haiguse ennetamisel ja nakkuse vähendamisel võivad potentsiaalselt rolli mängida biofungitsiidid.</p> <p>Käesoleva magistritöö eesmärk on hinnata kolme kaubanduslikult kättesaadava biofungitsiidi – Mycostopi, Prestopi ja Serenade ASO – mõju ristõieliste nuutri tõrjes. Laboritingimustes viidi 2020. aasta kevadel läbi potikatse patogeeniga nakatunud mullaga, mis koguti Viljandimaa tootmispõllult. Nii steriliseeritud kui ka steriliseerimata mulda töödeldi biofungitsiididega, kasutades kahte erinevat kulunormi. Mullaproovidest eraldati patogeeni DNA, millest määrati qPCR meetodiga patogeeni kontsentratsioon ja lisaks arvutati taimede haigusindeks.</p> <p>Tulemuste analüüsil ilmnes, et Prestop vähendas oluliselt patogeeni kontsentratsiooni mittesteriilses loomuliku nakkusega mullas ühekordse tooteetiketil toodud soovitusliku kulunormi juures. Mycostopi ja Serenade ASO töötluste puhul <i>P. brassicae</i> hulk ei vähenenud. Siiski, taimejuurte haigusindeks vähenes Serenade ASOga töötlemise järgselt. Steriliseeritud põllumullas ei omanud ühegi preparaadi kasutamine statistiliselt olulist mõju.</p> <p>Biofungitsiidide varieeruv efektiivsus võis tuleneda biofungitsiidides sisalduvate antagonistlike organismide erinevast toimemehhanismist, mulla madalast pH-st või kõrgeast nakkuse tasemest töödeldavas mullas. Antud uurimistöö tulemuste põhjal võib järeldada, et biofungitsiid Prestop võiks olla kaasatud ristõieliste nuutri integreeritud tõrjesse. Täpsemate järelduste tegemiseks</p>			

on vajalik läbi viia täiendavaid katseid biofungitsiidiga Prestop nii labori- kui ka põllutingimustes. Bioloogilise tõrje edasi arendamiseks võiks tulevikus isoleerida Eesti põllumuldadest kohaliku päritoluga antagonistlikke seene- või bakteritüvesid, mida katsetada *P. brassicae* tõrjeks.

Märksõnad: biotõrje, biofungitsiid, mullapatogeen, qPCR, ristõielised

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51006		Abstract of Master's Thesis	
Author: Marian Põldmets		Curriculum: Horticulture	
Title: Effect of biofungicides on clubroot disease			
Pages: 50	Figures: 6	Tables: 2	Appendixes: 2
Department / Chair: Plant Health Field of research and (CERC S) code: B390 Phytotechny, horticulture, crop protection, phytopathology Supervisors: Riinu Kiiker, <i>PhD</i> ; Kaire Loit, <i>MSc</i> Place and date: Estonian University of Life Sciences, 2021			
<p>Clubroot of crucifers is a root disease caused by the protist <i>Plasmodiophora brassicae</i>, responsible for causing significant economic damage to cruciferous crops. Clubroot is hard to manage since its resting spores are viable in soil for many years. Current methods to control <i>P. brassicae</i> are limited. Biological control methods are being increasingly investigated as a more viable alternative for controlling clubroot.</p> <p>The aim of this study was to assess the effect of commercially available biofungicides on the development of clubroot and its potential pathogen suppressive activity. In this study, the biocontrol efficacy of biofungicides Mycostop, Prestop and Serenade ASO against <i>P. brassicae</i> were evaluated on oilseed rape in a laboratory experiment. Soil samples already infected with <i>P. brassicae</i> were collected from a commercial field in Viljandi County. A pot experiment with six different treatment variants and five replicates at each were established. The data collected partially supported the original hypothesis. Out of three biofungicides, Prestop was found to reduce <i>P. brassica</i> levels in infected soil by more than 90%. The efficacy of Mycostop and Serenade ASO in suppressing <i>P. brassicae</i> was insignificant, although application of Serenade ASO reduced disease severity on plants.</p> <p>The efficacy of biofungicides may have varied due to the different mode of action of the antagonistic microorganisms. On the other hand, the effectiveness of biofungicides may also have been affected by the very high acidity of the soil, which favors disease development.</p>			

Based on the results of this research, it can be concluded that the biofungicide Prestop could be used as part of an integrated disease management program for the control of clubroot. Further studies with the biofungicide Prestop are required under both laboratory and field conditions to determine its efficacy against clubroot.

Keywords: biocontrol, biofungicide, crucifers, qPCR, soil pathogen

SISUKORD

LÜHENDITE LOETELU	6
SISSEJUHATUS.....	7
1. RISTÕIELISTE NUUTER JA SELLE TEKITAJA <i>PLASMODIOPHORA BRASSICAE</i>	9
1.1 Patogeeni olemus ja selle ohtlikkus taimekasvatuses.....	9
1.2 Haiguse sümptomid.....	11
1.3 Elutsükel ja paljunemine	12
1.4 Profülaktika ja tõrjemeetmed	14
2. BIOLOOGILINE TÕRJE TAIMEKASVATUSES	17
2.1 Bioloogiline tõrje ja antagonistlike mikroorganismide toimemehhanismid	17
2.2 Biopestitsiidid mullapatogeenide tõrjes	18
3. MATERJAL JA METOODIKA	20
3.1 Laborikatsed	20
3.2 Haigusindeksi määramine	21
3.3 DNA eraldamine	22
3.4 Muldadest <i>P. brassicae</i> hulga määramine molekulaarselt qPCR metoodikaga.....	22
3.5 Andmeanalüüs	24
4. TULEMUSED.....	25
4.1 Patogeeni kontsentratsioon mullaproovides laborikatse lõpus.....	25
4.2 Nakkuse esinemine taimedel	27
5. ARUTELU JA JÄRELDUSED	30
KOKKUVÕTE.....	36
EFFECT OF BIOFUNGICIDES ON CLUBROOT DISEASE.....	46
LISAD	48
Lisa 1. Tootmispõllu mulla keemilised näitajad	49
Lisa 2. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta	50

LÜHENDITE LOETELU

DNA (ingl *deoxyribonucleic acid*) – desoksüribonukleinhape

ID (ingl *disease index*) – haigusindeks

ITS (ingl *internal transcribed spacer*) – sisemine transkribeeritav speisser

qPCR (ingl *quantitative polymerase chain reaction*) – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

rRNA (ingl *ribosomal RNA*) – ribosomaalne ribonukleinhape

SISSEJUHATUS

Ristõieliste kultuuride seas üks enim kahju tekitav ja majanduslikult oluline mulla teel leviv haigus on ristõieliste nuuter (Hwang 2012). Seda põhjustab obligatoorne patogeen *Plasmodiophora brassicae*, kes suurema osa oma elutsüklist veedab rakusiseselt peremeestaimede juurtes või puhkeostena mullas (Kageyama, Asano 2009). Haigus väljendub pahataoliste moodustiste tekkimisega ristõieliste taimede juurtel, mis takistavad vee- ja toitainete omastamist ning mille tagajärjel taimede saagikus ja kvaliteet ajapikku langevad (Dixon 2009a).

Teraviljade järel on ristõielised majanduslikult kõige olulisemad põllukultuurid (Dixon 2014). Ristõielised kultuurid moodustavad teraviljade kõrval olulise osa Eesti põllumajandustoodangust. Kogu põllukultuuride kasvupinnast (985 456 ha) moodustasid ristõielised kultuurid 2020. aasta seisuga 71 352 hektarit, millest raps ja rüps kasvas 70 926 hektaril ja kapsas 426 hektaril (Statistikaamet 2021).

Käesoleval ajal ei ole ristõieliste nuutri vastu olemas ühtegi efektiivset ja tõhusat tõrjemeetodit või preparaati, mis aitaksid vältida patogeeni nakkusest tulenevaid saagikadusid (Deora *et al.* 2012, Donald, Porter 2009). Tõrjemeetodid piirduvad õige viljavahelduse, lupjamise ja resitsentsete sortide kasvatamisega, mis võimaldavad vähendada nakkuse taset mullas või ennetada põldudel haigusepuhanguid (Peng *et al.* 2014; Říčařová *et al.* 2016).

Bioloogiline tõrje mikrobioloogiliste antagonistlike organismidega on osutunud paljulubavaks alternatiivseks ja keskkonnasäästlikuks tõrjemeetodiks vähendamaks sünteetiliste taimekaitsevahendite keskkonnasurvet (Syed-Ab-Rahman *et al.* 2018). Ristõieliste nuutri tõrjes on katsetatud erinevaid antagonistlikke mikroorganisme, mis on andnud lootustandvaid tulemusi haiguse allarurumisel (Li *et al.* 2020; Arif *et al.* 2021; Lahlali *et al.* 2013). Sobivate tõrjevõimaluste otsimine ristõieliste nuutritele on aktuaalne patogeeni kiire leviku, ohtlikkuse ning efektiivsete tõrjevõimaluste piiratuse tõttu.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on hinnata biofungitsiidide mõju ristõieliste nuutritekitaja arengu takistamisel ja leida sobivad biopreparaadid Eesti tingimustesse. Laborikatses testitakse kolme erineva biofungitsiidi Mycostop, Prestop ja Serenade ASO mõju, mida hinnatakse mullas patogeeni hulga määramisega, kasutades spetsiifilist molekulaarset metoodikat.

Uurimustöö eesmärgid põhinevad uurimuses seatud hüpoteesile:

- Biofungitsiidid vähendavad ristõieliste nuutritekitaja (*P. brassicae*) hulka mullas ja nakkust taimedes.

Tänuavaldused: Töö on valminud Eesti maaelu arengukava (MAK) 2014–2020 Innovatsiooniklastri toetuse meetmest. Töö autor tänab oma juhendajaid Riinu Kiikerit ja Kaire Loit'i igakülgse toetuse ja heade nõuannete eest. Samuti kuuluvad tänusõnad kõigile neile, kes antud töö valmimisele kaasa aitasid: Madis Vaher (Bayer OÜ), Margus Liesment Marguse-Mäeotsa talust ning Meelis Värnik ja Tiiu Annuk PÜ Kevili-st.

1. RISTÕIELISTE NUUTER JA SELLE TEKITAJA *PLASMODIOPHORA BRASSICAE*

1.1 Patogeeni olemus ja selle ohtlikkus taimekasvatuses

Plasmodiophora brassicae Woronin on obligatoorne protistist mullapatogeen, mis kuulub Rhizaria supergruppi, Phytomyxea klassi ja seltsi Plasmodiophorida (Hittorf *et al.* 2020). *P. brassicae* identifitseeriti 1887. aastal kui ristõieliste nuutrit põhjustav organism (Woronin 1878).

Tegemist on paljusid ristõielisi köögivilju ja põllukultuure (Gahatraj *et al.* 2019) ohustava majandusliku tähtsusega taimepatogeeniga, mis on levinud rohkem kui 60 riigis (Dixon 2009a). Agressiivse kuluga taimepatogeeni levik on hoogustunud peamiselt õlirapsi intensiivse viljelemise tõttu ning kaasa toonud märkimisväärse saagikuse ja saagi kvaliteedi languse mitmete oluliste ristõieliste põllu- ja aiakultuuride seas (Diederichsen *et al.* 2016). Pageau *et al.* (2006) andmetel põhjustas patogeenile vastuvõtliku rapsi genotüübi kasvatamine ligi 90% suurst saagikadu (Pageau *et al.* 2006). Haigus on levinud globaalselt (Dixon 2009a), sh nendes Euroopa riikides (Czubatka-Bieńkowska *et al.* 2020; Wallenhammar *et al.* 2016), kus kasvatatakse laialdaselt rapsi ja teisi ristõielisi köögivilju.

Patogeeni peremeestaimede hulka kuuluvad mitmed populaarsed köögiviljakultuurid nagu peakapsas, brokoli, lillkapsas, naeris, kaalikas, rüps ja raps jpt. (Howard *et al.* 2010), kuid haigusele vastuvõtlikud on veel ka ristõielised umbrohud, rõika (*Raphanus*) ja levkoi (*Matthiola*) perekonda kuuluvad taimeliigid, kuldlaak (*Cheiranthus cheiri*) ja müürlook (*Arabidopsis*) (*Ibid*). Juurekarvade nakatumine võib toimuda ka mitteperemeestaimedel nagu näiteks salat ja spinat, kuid nende juurtel ei kujune välja pahataolisi moodustisi (Murakami *et al.* 2002). Tõenäoliselt on puhkeeoste idanemine ilma sobiva peremeestaimeta muldades takistatud (Takahashi 1994). Kuna *P. brassicae* nakatab ka teisi ristõielisi taimi ja umbrohtusid, siis nakatunud põllud ristõieliste kasvatamiseks üldiselt enam ei sobi (Auer ja Ludwig-Müller 2015).

Puudulik viljavaheldus ja vastuvõtlike peremeestaimede sagedane kasvatamine soodustavad patogeeni puhkeeoste kiiret paljunemist ja levimist põllumullas (Hwang *et al.* 2012; Laila *et al.*

2017). Patogeeni populatsioonid on väga heterogeensed, mistõttu võib ühel põllul esineda mitu erinevat patogeeni patotüüpi (Diederichsen 2003). Tulenevalt patogeeni puhkeoste vastupidavusest ja võimest püsida mullas elujõulisena kuni 20 aastat (Wallenhammar 2010), on haiguse tõrje ja olemasoleva nakkuse kontrolli all hoidmine äärmiselt keeruline protsess. Kõrge nakkustase põllul raskendab külvikordade ja masinate liikumise planeerimist, muutes põlluharimise komplitseeritumaks ja kallimaks. Samuti kahaneb nakkuse esinemisel maa varaline ja põllumajanduslik väärtus, sest antud põldudel ei ole ristõieliste kasvatamine enam tasuv (Dixon 2009a).

Kui nakkus on arenenud kaugele ja juurtele tekib nuutrile iseloomulik haiguspilt, siis on reageerimiseks juba hilja ja asjakohased tõrjemeetmed ei oma mõju (Czubatka-Bieńkowska *et al.* 2020). Seetõttu on enne ristõieliste põllule külvamist tarvis kindlaks teha nakkuse hulk mullas, et vähendada saagikadude esinemist (Donald, Porter 2009). Patogeeni varajase avastamise korral on võimalik pidurdada nakkuse edasist levikut ja otsustada mitteristõieliste põllukultuuride kasvatamise kasuks (Jedryczka *et al.* 2014). Selleks, et sümptomid avalduksid ja esineks hinnatav mõju kasvatatava kultuuri saagikusele, on hinnatud, et patogeeni puhkeoste hulk 1 grammi kuiva mulla kohta peab olema vähemalt 1000 puhkeost (Donald, Porter 2009).

Nakkuse tuvastamiseks mullas on kasutusel molekulaarsed meetodid, mis lisaks resistentsete sortide kasvatamisele, vähendavad saagikadude riski (Říčařová *et al.* 2016). Sellisteks meetodideks on patogeeni spetsiifiliste praimeritega teostatud polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) tehnikad, mille abil amplifitseeritakse ehk kordistatakse teatud lõike *P. brassicae* genoomist ja määratakse patogeeni olemasolu mullas (Hwang *et al.* 2012). Veel enam, kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsiooni meetod (qPCR), mis põhineb fluorestsentssignaali tuvastamisel patogeeni DNA amplifikatsiooni käigus, võimaldab kindlaks teha muuhulgas ka patogeeni kontsentratsiooni proovis (*Ibid.*).

Poolas ja Rootsis (Wallenhammar *et al.* 2012; Almquist *et al.* 2016; Czubatka-Bieńkowska *et al.* 2020) on talunikele välja töötatud juhtnöörid ristõieliste köögiviljade ja rapsi kasvatamiseks, mis põhinevad patogeeni tuvastamisel mullast qPCR meetodil. Patogeeni kontsentratsiooni määramine mullaproovidest on potentsiaalne integreeritud ristõieliste nuutri tõrjemeede, mis aitaks talunikel teha kaalutletud otsuseid seoses ristõieliste kasvatamisega ja vältida haiguspuhanguid ja sellest tulenevaid saagikadusid põldudel (Wallenhammar 2021). Kanadas on selleks hiljuti välja töötatud interaktiivne kaart ClubrootTracker, mille eesmärgiks on koguda informatsiooni nuutri leviku kohta maailma erinevates piirkondades ja ennetada haiguse levikut kohalikul tasandil nakatumata maa-aladele (Muirhead *et al.* 2020).

1.2 Haiguse sümptomid

Nakkus lööbib esmalt juurtel, ilma et taime maapealsetel osadel ilmneksid nähtavad sümptomid. Esmased sümptomid sarnanevad veepuudusega: arengu pidurdumine, lehtede longu vajumine ja kogu taime närbumine kuumadel päikesepaistelisel päeval, isegi kui muld on piisavalt niiske (Gahatraj *et al.* 2019). Lehed kolletuvad või muutuvad lillakaks ja taimel võib välja kujuneda nn. hädaküpsus (Hwang *et al.* 2012). Hilisemas arengujärgus nakatunud taimedel ei pruugi maapealsed sümptomid välja lüüa, ent taimed vananevad sellegipoolest enneaegselt (Howard *et al.* 2010). Haiguse areng sõltub olulisel määral ilmast, seega ei pruugi igal aastal taimedel sümptomid avalduda (Říčařová *et al.* 2016).



Joonis 1. Rapsi juurtele moodustunud pahataolised moodustised (Fotod: Riinu Kiiker, 2019)

Nuutriga nakatunud taimed on teistega võrreldes kääbusja kasvuga ja suurte pruunide pahataoliste moodustistega juurtel (Joonis 1), millest enamik jääb saagikoristuse järgselt mulda (Auer ja Ludwig-Müller 2015). Tekkivaid pahataolisi moodustusi juurtel võib segamini ajada ristõieliste kahjuri juure-peitkärsaka (*Ceutorhyncus pleurostigma*) poolt tekitatud kahjustustega (Dixon 2009a).

Juurtel tekkinud pahataolised moodustised takistavad vee- ja toitainete transporti taimekudedes, mis omakorda mõjutab taime kasvu, arengut ja saagi moodustumist (Manzanares-Dauleux *et al.* 2006; Dixon 2006). Fotosünteesi pidurdumise tõttu esineb nakkuse hilisemates etappides toitainete puudus ülemistes taimeosades, mis viib järk-järgult peremeestaime närbumiseni ja surmani (Ludwig-Müller 1999). Juurepahkade lagunemise järgselt vabanevad nendest mulda puhkeosad, mis on elujõulised aastaid (Wallenhammar 2010) ja nakkustsükkel kordub uute peremeestaimede olemasolu korral.

Patogeen levib nakatunud põllul ebaühtlaselt, seega kipub kahjustuspilt ühe põllu piires olema varieeruv (Wallenhammar 1998), ent juba väikese nakkuse hulga korral võib langeda kasvatatava põllukultuuri tootmise tasuvus ja kannatada saagikus (Strehlow *et al.* 2015).

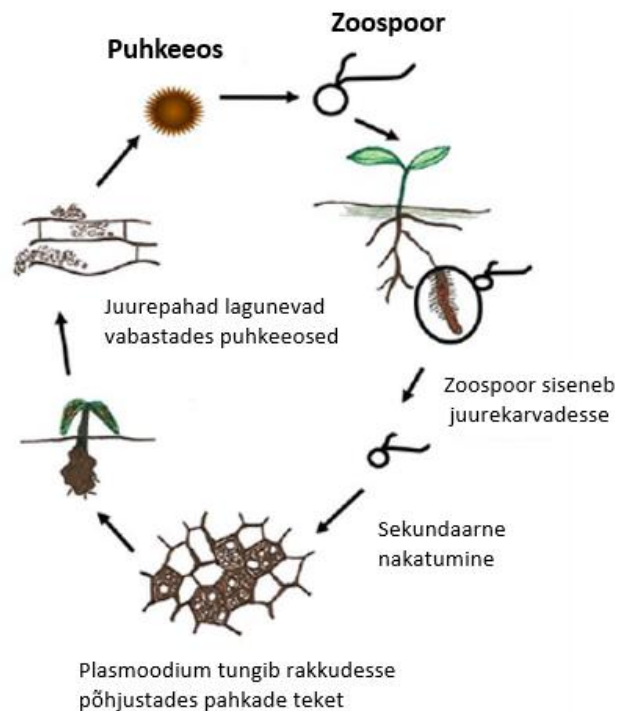
1.3 Elutsükkel ja paljunemine

P. brassicae elutsükkel on võrdlemisi keeruline ja koosneb peamiselt kolmest etapist (Kageyama, Asano 2009):

1. puhkeoste säilimine mullas;
2. juurekarvade esmane nakatumine primaarsete zoosporidega;
3. teisene nakatumine sekundaarsete zoosporide moodustumisega.

P. brassicae elutsükkel saab alguse mullas või taimejäänustel paiknevatest puhkeostest (Joonis 2), millel on välja kujunenud võime pidada vastu ebasoodsates ilmastikutingimustes ja säilitada haigustekitaja elujõulisus ja pikaajalisus (Dixon 2009b). Patogeeni levikut soodustavad mõõdukad temperatuurid vahemikus 22-24°C (Korbas *et al.* 2009) ja soojad ning niisked sügisilmad (Říčařová *et al.* 2016).

Sobiva peremeestaime olemasolul idanevad mullas puhkeosad, mis vabastavad esmaseid taime juurtesse tungivaid zoospoore (Takahashi 1994). Seejärel moodustuvad juurekarvas plasmoodiumid, mis tuuma jagunemise tulemusena moodustavad omakorda zoosporangiumid (Gahatatraj *et al.* 2019). Nendest vabanevad 4-14 sekundaarset zoospori, mis tungivad läbi peremeestaime juure välimise kihi (Kageyama, Asano 2009). Antud lühike ajaraam on ainus periood patogeeni elutsükli, mil haigustekitaja on keskkonnatingimuste suhtes haavatav (Dixon 2009b). Hiljem areneb välja sekundaarne plasmoodium, mida seostatakse rakkude suurenemise tagajärjel juurtele tekkivate pahataoliste paksenditega (*Ibid.*).



Joonis 2. *Plasmodiophora brassicae* elutsükkel (Modifitseeritud Auer ja Ludwig-Müller 2015 järgi).

Nakkuse hilisemas staadiumis vabastavad plasmoodiumid puhkeosed, mis peremeestaime kudede lagunemise järel jäävad mulda talvituma (Ludwig-Müller *et al.* 1999) ja on ebasoodsatele keskkonnatingimustele äärmiselt vastupidavad (Korbas *et al.* 2009). Elusad peremeesrakud soodustavad *P. brassicae* puhkeoste tootmist, teisalt kiirendab peremeesrakkude surm puhkeoste valmimist (Al-Daoud *et al.* 2020). Patogeeni puhkeoste poolestusaeg on kirjanduse andmetel ligikaudu 4 aastat (Wallenhammar 2010), seega langeb puhkeoste elujõulisus ilma sobiva peremeestaime olemasoluta juba esimese kahe aasta jooksul (Ernst *et al.* 2019).

1.4 Profülaktika ja tõrjemeetmed

Patogeen veedab suure osa oma elutsüklist kaitstud keskkonnas, kas peremeestaimede moondunud struktuurides või paksukestaliste puhkeostena mullas, mistõttu on selle keemiline tõrje ka süsteemsete pestitsiididega väga keeruline (Dixon 2009b, 2014).

Suurtel aladel kasvatatavate põllukultuuride puhul pole taimede fungitsiididega töötlemine tasuv ega praktiline meede (Peng *et al.* 2014). Sünteetiliste preparaatide kahjuks osutub ka patogeeni võimaliku resistentsuse tekkimine ja negatiivsed mõjud mitte-sihtorganismidele ja keskkonnale (Compant *et al.* 2005). Vaatamata sellele, et Jaapanis ja Uus-Meremaal on ristõieliste nuutri tõrjes laialdaselt kasutuses flusulfamiid (Donald, Porter 2009), ei ole enamik fungitsiide selle haiguse puhul efektiivsed (Gossen *et al.* 2011) ja käesoleval ajal ei ole nuutri tõrjeks heaks kiidetud ühtegi laialdaselt kasutatavat sünteetilist taimekaitsevahendit (CABI 2021).

Seniajani on resistentsete sortide kasvatamine ja viljavaheldus kõige tõhusamad ning keskkonnasõbralikumad viisid haiguse ennetamiseks (Peng *et al.* 2014; Liu *et al.* 2018b). Need meetodid takistavad ka uute virulentsemate patotüüpide selektsiooni (Fähling *et al.* 2003).

Korralik viljavaheldus on üks peamiseid haiguspuhangu ennetamise eeldusi. Ristõieliste kultuuride kasvatamisel soovitatakse samal põllul vahet pidada 5 kuni 6 aastat (Talirapsi kasvatamine 2013), mõnedel andmetel lausa 7-10 aastat, hoides seejuures põld puhas ristõielistest umbrohtudest ja kaasates külvikorda mitteperemeestaimed nagu teraviljad, kartul või peet (Korbas *et al.* 2009). Tugeva nakkusega mullas võib kuluda ka ilma peremeestaimedeta ligikaudu 18 aastat enne, kui nakkuse tase langeb piisavalt madalale, et patogeeni mullast enam ei tuvastata (Wallenhammar 1996). Rotatsiooni pikkus oleneb konkreetse põllu seisundist ja mullaomadustest ning enne ristõieliste kasvatamist on põllul soovituslik läbi viia vastavad analüüsid, et kindlaks teha patogeeni esinemine mullas (Wallenhammar 2014). Põldudel, kus nakkuse tase on kõrge, soovitatakse intervallide vastuvõtlike kultuuride kasvatamisel pikendada (Howard *et al.* 2010).

Taimede haigusresistentsus väljendub eelkõige patogeeni arengu pärssimisel taimes: toimub küll nakatumine, kuid tekkinud plasmoodiumid ei arene välja ja puhkeoseid ei moodustu (Hwang *et al.* 2011b; Deora *et al.* 2013). Resistentsusgeenid ristõielistel kultuuridel on üldiselt

patogeenispetsiifilised (Auer ja Ludwig-Müller 2015), kuid sellele vaatamata on leitud tõendeid uutest patotüüpidest, mis on võimelised ületama sortide resistentsusgeene (Strelkov *et al.* 2016). Seetõttu ei saa resistentsete sortide kasvatamine olla ainuke rakendatav tõrjemeede, kuna see üksinda ei elimineeri haigustekitajat mullast (Hwang *et al.* 2014). Lisaks sellele soovitatakse resistentsete sortide seemned külvata põldudele, kus haigus on esinenud eelnevatel aastatel (> 30% haigestunud taimedest), kuid mitte rakendada seda profülaktilise meetmena (Diderichsen *et al.* 2006). Samas, kui nakkuse hulk põllul on suur ja eoste kontsentratsioon põllul ületab 130 000 *P. brassicae* puhkeest ühe grammi põllumulla kohta, siis ei ole ka resistentsete sortide kasvatamine enam soovituslik (Wallenhammar 2012; Czajka *et al.* 2020).

Nakkuse levikut soodustavad halva struktuuri ja drenaažiga liigniisked mullad, kuna patogeeni zoosporid liiguvad edasi vee abil (Dixon 2014). Põldudelt soovitatakse likvideerida võimalikud liigniiskuse põhjused, kuna just kõrge mullaniiskuse korral on zoosporid mobiilsed ja nakatavad terveid taimi (Gahatraj *et al.* 2019). Seega on oluline parandada mulla füüsikalisi omadusi ja vältida mulla tihenemist. Mulla veeläbilaskvuse parandamiseks on vajalik kasutada orgaanilisi sisendeid ja rakendada minimeeritud harimist. Põllukultuuride kastmiseks kasutatav vesi ei tohi olla saastunud nuutri puhkeostega, kuna sellega on võimalik nakatada suuri haigusvabasid alasid (Howard *et al.* 2010).

P. brassicae populatsiooni levikut põllul mõjutavad ka põhikultuuri järgselt tahtmatult levima hakanud ristõielised umbrohud ja isekülvanud taimed, mistõttu on mullaharimine ja koristusjärgne umbrohutõrje vajalikud meetmed patogeeni elutsükli katkestamiseks (Zamani-Noor, Bodemann 2018). Taimejäänused, mis on võimalikud puhkeoste reservuaarid, tuleks põhikultuuri koristuse järgselt eemaldada ja hävitada (Gahatraj *et al.* 2019). Umbrohutõrje tuleb läbi viia võimalikult varakult paari nädala jooksul alates põllukultuuri külvamisest, et patogeenile peremeestaimeks olevad umbrohud, ei nakatuks ega toodaks mulda puhkeosid (Al-Daoud *et al.* 2020), mis kujutavad ohtu põllukultuurile kasvuhooajal ja ka edaspidi.

Nakatunud muld kantakse laiali mitmesuguste põllutöömashinade ja -seadmetega, millega liigutakse ühelt põllult teisele (Gossen *et al.* 2014), seega on oluline vältida saastunud mulla laialikandumist ühelt põllult teisele põllule jalatsite, mashinate, sõidukite, tööriistade ja seadmetega (Howard *et al.* 2010). Vältimaks nakatunud mulla ja taimejäänuste levimist, tuleks enne uutele põldudele viimist puhastada ja võimaluse korral desinfitseerida põllutööriistad ja -masinad (Hwang *et al.* 2014).

Patogeen eelistab oma arenguks happelisema reaktsiooniga muldi, mistõttu on kõrgema mulla pH korral nakkuse areng aeglasem (Takahashi 1994; Donald 2009). Teisalt, kui nakkuse tase mullas on piisavalt suur ja muud keskkonnatingimused on soodsad, areneb haigus mulla pH-st sõltumata edasi (Gossen *et al.* 2014). Haguse raskusastet seostatakse ka kaltsiumi sisaldusega mullas (Murakami *et al.* 2002). Haiguse levikut aitab kontrollida regulaarne lupjamine kaltsiumi sisaldavate lubiväetistega (*Ibid.*). Teisalt võib pidev lupjamine mulla seisukorda halvendada ja viia pinnase degradeerumiseni, süvendades põuaperioodidel boori puudust mullas (Auer ja Ludwig-Müller 2015).

Deora *et al.* (2011) täheldas boori pärssivat mõju ristõieliste nuutri arengule rapsil, seega võib booriga väetamine olla üks võimalikest integreeritud taimekaitse komponentidest. Samale järeldusele on jõudnud ka Rootsi teadlased, kuna madala boorisaldusega mullad on Rootsis tavaline nähtus (Wallenhammar 2014).

Kuna nakkuse areng on madalatel temperatuuridel takistatud ja nooremad taimed on haigusele vastuvõtlikumad, siis on üks võimalik ennetav meede rapsi külviaja muutmine (Hwang *et al.* 2011a). Kanadas läbi viidud katsetega tõestati, et suvirapsi varajasema külvi tulemusel oli puhkeoste idanemine pärsitud ja kokkuvõttes saadi suurem ja kvaliteetsem saak (*Ibid.*).

Toetudes eeltoodule, tugineb ristõieliste nuutri tõrje ennetavatele agrotehnoloogilistele võtetele nagu viljavaheldus, nuutrikindlate sortide kasvatamine ja lupjamine, samuti põllumasinat- ja tööristade puhtana hoidmine, mis parandavad mulla fütosanitaarset seisundit ja aitavad vältida puhkeoste levikut nakkusvabale põllule.

2. BIOLOOGILINE TÕRJE TAIMEKASVATUSES

2.1 Bioloogiline tõrje ja antagonistlike mikroorganismide toimemehhanismid

Bioloogilise tõrje all mõistetakse kindla antagonistliku mikroorganismi pärssivat mõju taimepatogeenile ühes viljelussüsteemis ehk teisisõnu seisneb biotõrje mikroorganismide omavahelistes interaktsioonides, eelkõige patogeenide antagonistlikes suhetest teiste mikroorganismidega, kellega nad kokku puutuvad (Pal, McSpadden Gardener 2006).

Bioloogiliste taimekaitsevahendite ehk bioloogiliste pestitsiidide koostisosad on looduslikku päritolu (loomad, taimed, bakterid ja teatud mineraalid) (Kumar 2012). Need jagunevad laias laastus kolmeks rühmaks: mikroobsed pestitsiidid, looduses vabalt leiduvad ained ehk biokeemilised pestitsiidid ja taimede poolt toodetavad pestitsiidsed ained (ingl *plant-incorporated protectants*) (EPA 2016). Biopestitsiidide peamine eelis on see, et need on sihtmärgispetsiifilised, keskkonnale ohutud ja lagunevad looduses kiiresti (Kumar 2012), mis teeb neist jätkusuutlikud alternatiivid sünteetiliste taimekaitsevahenditele.

Mikroobsed biopestitsiidid sisaldavad elusorganisme (bakterid, seened, viirused), mis on kindlale kahjurile pärssiva mõjuga (Kachhawa 2017). Pestitsiidse toimega mikroorganismid pärinevad peamiselt põllumaadelt, kus need eksisteerivad koos patogeensete ja kasulike mikroobidega (Song *et al.* 2012). Bioloogilise tõrjevahendina sobivad mikroobid on need, mis elutsevad risosfääris ja kus muld on loomupäraselt patogeensetele organismidele pärssiva toimega (Syed-Ab-Rahman *et al.* 2018).

Mikroobsed bioloogilised toimeained (ingl *microbial biological control agents* - MBCAs) kaitsevad põllukultuure haiguste eest erinevate mehhanismide kaudu: need võivad taime kudedes esile kutsuda resistentsuse, suurendada vastupanuvõimet patogeeni suhtes (Pieterse *et al.*, 2014; Conrath *et al.* 2015) või konkureerida patogeeni toitaine ja ruumi pärast ilma otsese antagonistliku interaktsioonita (Spadaro, Droby 2016). Selliseid mehhanisme nimetatakse kaudseteks antagonistlikeks vastastikmõjudeks.

Teisalt võivad mikroobsed toimeained pärssida taimehaigusi taimepatogeene otseste antagonistlike interaktsioonide teel, milleks on hüperparasitism, antibioos või mikroobsete sekundaarsete metaboliitide tootmine patogeenide vastu (Raaijmakers, Mazzola 2012). Hüperparasitismi ja antibioosi puhul sekkuvad antagonistlikud organismid otsesel viisil patogeeni elutegevusse (Köhl *et al.* 2019). Antibioos seisneb teatud mikroorganismide võimes mõjuda teistele organismidele pärssivalt või surmavalt nende poolt toodetavate bioloogiliselt aktiivsete ühendite kaudu (Stenberg *et al.* 2021). Bioloogilise tõrje mehhanismiga on tegu juhul, kui kasulikud organismid toodavad kohapeal bioloogiliselt aktiivseid aineid, millel on kahjuritele otsene negatiivne mõju (*Ibid.*).

Haiguste tõrje seisukohalt on oluline bioloogiliste toimeainete püsivus, sest need peavad kaitsemehhanismi saavutamiseks konkureerima risosfääris teiste mikroobsete liikidega (O'Brien 2017). Nende efektiivsus sõltub enamjaolt taimede ja mikroobide omavahelistest keerulistest reguleeritud vastastikmõjudest (Köhl *et al.* 2019).

Bioloogiline tõrje võib aset leida ka loomulikul teel. Taimepatoloogias tuntakse sellist fenomeni nagu „taimehaigusi pärssivad mullad“ (ingl *disease suppressive soils*), mis viitab mõnede muldade võimele piirata mulla kaudu levivate spetsiifiliste taimepatogeenide põhjustatud haigusi vastuvõtlikel peremeestaimedel (Cook, Baker 1983). Haigusi pärssivad mullad võivad nõrgestada patogeeni, vähendades selle kasvu ja arengut, ja seeläbi taimede nakatumist (Říčařová *et al.* 2016). Tõenäoliselt pärsib patogeeni elutegevust abiootiliste ja biootiliste tegurite kompleks (Dixon 2009b).

2.2 Biopestitsiidid mullapatogeenide tõrjes

Mõned kõige olulisemad mullas levivad haigused on põhjustatud mullas elutsevate patogeensete organismide poolt, kellel on lai peremeestaimede ring ja võime moodustada püsivaid ellujäämisstruktuure (Shafique *et al.* 2016). Mullapatogeenide tõrje on kompleksne ülesanne, kuna haigustekitajad paiknevad aktiivse mikroobse elustikuga risosfääris, kus lühikese aja jooksul leiavad aset pidevad muutused (Handelsman, Stabb 1996).

Mikroorganisme, keda kasutatakse biotõrjevahenditena mullas levivate patogeenide tõrjeks kuuluvad bakterid perekondadest *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp., ja seeneliigid perekondadest *Coniothyrium* spp., *Gliocladium* spp., *Phlebiopsis* spp. ja

Trichoderma spp., ent hetkel on Euroopas registreeritud vaid üksikud bioloogilised toimeained põllukultuure ohustavate mullapatogeenide vastu (Pertot *et al.* 2015). Seetõttu on mullapatogeenide tõrjeks mõeldud bioloogiliste tõrjevahendite kättesaadavus praegusel ajal Euroopas taimekasvatajatele piiratud (*Ibid.*).

Hetkel on Eestis läbinud turule lubamise protseduuri ja kantud taimekaitsevahendite registrisse 12 bioloogilist taimekaitsevahendit, millest 8 on erinevatel avamaa- ja kasvuhoonekultuuride tõrjeks näidustatud biofungitsiidid (Põllumajandus- ja Toiduamet 2021). Nende toimeainete hulka kuuluvad erinevad seeneliigid nagu *Clonostachys rosea* (endise nimega *Gliocladium catenulatum*), *Phlebiopsis gigantea*, *Trichoderma harzianum* ja bakterid *Bacillus subtilis* ning *Streptomyces* sp., millest enamik on mõeldud erinevate mullas või taimejäänustel säilivate patogeenide tõrjeks (*Ibid.*)

Biopestitsiidide patogeene pärssiv toime ei pruugi põllutingimustes avalduda samamoodi nagu laborikatsetes. Biotõrjevahendite efektiivsuse erinevused labori- ja põllukatsetes võivad olla tingitud abiootiliste tegurite mõjudest, mullatüübi ja -omaduste erinevusest, samuti mullas esinevate mikroorganismide olemasolust (Gossen *et al.* 2016), mis võivad omakorda konkureerida mulda lisatud mikroorganismidega (Glick 2020). Tulemuste varieeruvus labori- ja põllutingimustes viitab sageli patogeeni, bioloogilise preparaadi toimeaine ja keskkonna omavahelistele keerulistele interaktsioonidele (Law *et al.* 2017).

3. MATERJAL JA METOODIKA

3.1 Laborikatsed

Katses kasutatud *P. brassicae* puhkeestega nakatunud muld koguti 18.09.2019 Viljandimaal Saksakülas asuvalt suvirapsipõllult (58°25'66"N 25°36'08"E). Põllumulla agrookeemilised näitajad on välja toodud lisas (LISA 1). Antud tootmispõllul täheldati visuaalsel vaatlusel laialdast ristõieliste nuutri nakkust. Kogutud mullaproovid säilitati seejärel külmkambris 4 °C juures.

Tabel 1. Laborikatses kasutatud preparaadid ja nende kontsentratsioonid

	Katsevariant (preparaat)	Kontsentratsiooni variant	Kulunorm	Korduste arv
Mittesteriilne muld	Mycostop	I	5g/100 m ²	5
		II	10g/100 m ²	5
	Prestop	I	500g/100 m ²	5
		II	1000g/100 m ²	5
	Serenade ASO	I	40ml/100 m ²	5
		II	80ml/100m ²	5
	Kontroll			5
Steriilne muld	Mycostop	I	5g/100 m ²	5
		II	10/100 m ²	5
	Prestop	I	500g/100 m ²	5
		II	1000g/100 m ²	5
	Serenade ASO	I	40 ml/100 m ²	5
		II	80 ml/100 m ²	5
	Kontroll			5
KOKKU				70

Enne laborikatse rajamist osa mullast autoklaaviti 121 °C juures 20 minutit, et hävitada bioloogiliselt aktiivne mulla mikroelustik. Teine osa mullast jäi autoklaavimata kujule.

Potikatses viidi läbi kontrollitud tingimustes ajavahemikus 13.04.2020-8.06.2020 kolme erineva preparaadiga ja kahe erineva kulunormiga: PTA Taimekaitsevahendite registri andmetel ühe- ja poolekordne norm (Tabel 1). Katses kasutati biofungitsiidide, mille toimeaineteks olid antagonistlikud seene-või bakteritüved:

- Mycostop (*Streptomyces* K61, varasemalt *S. griseoviridis* K16), Danstar Ferment, Baltic Agro;
- Serenade ASO (*Bacillus amyloliquefaciens* QST 713, varasemalt *B. subtilis* QST 713), Bayer;
- Prestop (*Clonostachys rosea* J1446, varasemalt *Gliocladium catenulatum* J1446), Danstar Ferment, Baltic Agro.

Katse viidi läbi viies korduses (Tabel 1). Samasugused töötused viidi läbi nii mittesteriilse mullaga kui ka steriilse mullaga, mille igat potti inokuleeriti umbes 100 *P. brassicae* puhkeosega.

Steriliseerimata mullaga täidetud potte kui ka steriilse inokuleeritud mullaga täidetud potte oli 35. Kokku oli katsepotte 70, kuhu külvati 2-3 ristõieliste nuutrite vastuvõtliku suvirapsi (*Brassica napus* var. *napus*) sordi 'InV110 CL' (BASF) seemet. 0,05%-se Mycostopi ja 1%-se Serenade ASO vesilahustega töödeldi potte katse rajamisel, 0,5%-se Prestopi vesilahusega mulla töötlemine toimus taimede tärkamise faasis (BBCH13).

Kasvutingimused kontrollitud kasvukambris olid järgmised: valgusperiood 16 h, temperatuur 21°C ja suhteline õhuniiskus 60%. Katsepotte kasteti 2 korda nädalas 100-200 ml veega. Katse lõpus mullad kuivatati ja säilitati toatemperatuuril paberkottides kuni analüüsimiseni.

3.2 Haigusindeksi määramine

Laborikatse lõpus määrati kõikidel potis kasvanud taimede juurte haigusindeks. Taimede juured raputati mullast puhtaks ning hinnati visuaalselt sümptomite esinemist ja taimede seisukorda. Selleks kasutati spetsiaalset hindamisskaalat vahemikus 0–3 (Kuginuki *et al.* 1999), kus: 0 - juurepahad puuduvad, 1 - kõrvaljuurtel mõned väikesed juurepahad, 2 - mõõdukad juurepahad, 3 - peajuurel suured juurepahad. Nakkuse raskusastet taimedel hinnati haigusindeksi järgi (ID), mis arvutati Strelkov *et al.* (2006) valemi põhjal:

$$ID = \frac{\sum(n \times 0 + n \times 1 + n \times 2 + n \times 3)}{N \times 3} \times 100\%, \text{ kus}$$

\sum - kogusumma

n - taimede arv töötlusvariandis*

0, 1, 2, 3 - sümptomite raskusastme klassid

* Taimede arv töötlusvariantides varieerus, kuna pottides tärkas erinev arv taimi.

Haigusindeks arvutati välja iga töötlusvariandi põhjal eraldi nii steriilses kui ka mittesteriilses mullas ning märgiti protsentuaalselt.

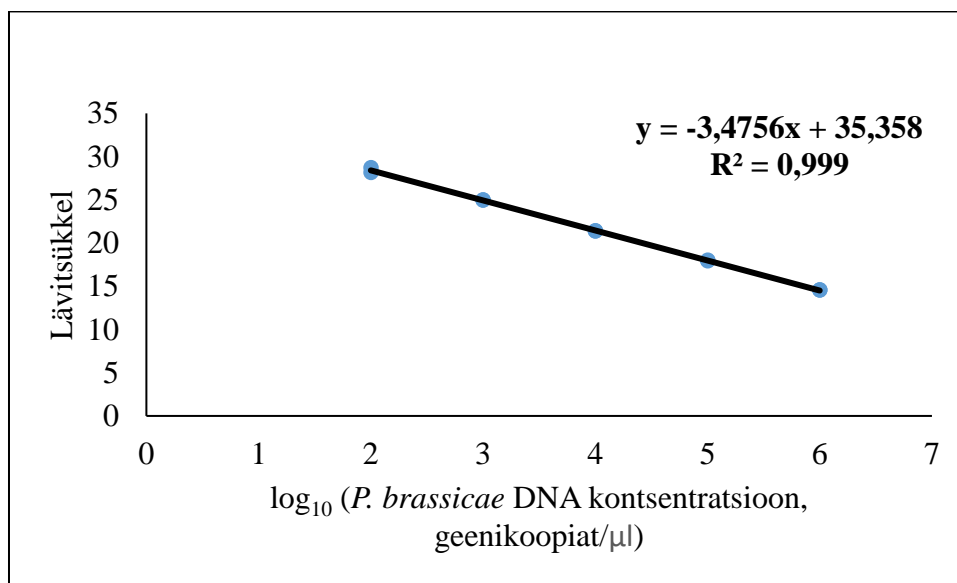
3.3 DNA eraldamine

Homogeniseeritud mullakottidest kaaluti kaks 0,2 g proovi steriilsetesse 2 ml mikrotsentrifuugituubidesse ja üks proov 50 ml tsentrifuugitopsi. Tuubidesse lisati kolm roostevaba metallkuuli ja homogeniseeriti MixerMill MM400 (Retsch, Saksamaa) raputis. DNA eraldamiseks kasutati Power Soil DNA Isolation Kit (Qiagen, USA) komplekti vastavalt tootjapoolsele protokollile. Iga eraldatud proovi DNA kontsentratsioon määrati NanoDrop 2000 spektrofotomeetriga (Thermo Fisher Scientific, USA.). Seejärel säilitati DNA -20 °C juures kuni edasiste analüüsideni.

3.4 Muldadest *P. brassicae* hulga määramine molekulaarselt qPCR metoodikaga

Kvantitatiivse polümeraasiahelreaktsiooni (qPCR) läbiviimiseks valmistati spetsiaalne segu lõppmahuga 20 µl, kuhu lisati steriilne destilleeritud vesi, 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix (Solis BioDyne, Eesti) ühekordse lõppkontsentratsiooniga, *P. brassicae* ITS regiooni spetsiifilised praimerid Pbra4-1F TACCATACCCAGGGCGATT ja PbraITS6R CAACGAGTCAGC TTGAATGC (Sundelin *et al.* 2010) lõppkontsentratsiooniga 0,3 mM ja proovi DNAd 1 µl (kontsentratsiooniga umbes 10 ng/µl). Iga proovi analüüsiti kolmes korduses. Geenikoopiate arvu määramiseks uuritavates proovides kasutati qPCR-i

standardkõvera meetodit, mis teostati Rotor-Gene Q (Qiagen) masinaga. Amplifitseeritav DNA tuvastatati reaktsiooni jooksul fluorestsentssignaalide abil, mille tõus on proportsionaalne amplifitseeritava DNA hulga. DNA-d tuvastatakse ja kvantifitseeritakse reaajas ehk qPCR tööseeria jooksul, mis koosneb 40 tsüklist, mis omakorda jagunevad kolme etappi: denaturatsioon, praimerite seondumine ja DNA süntees.



Joonis 3. Standardkõver moodustub *Plasmodiophora brassicae* kontsentratsioonide qPCR läbitsükli väärtuste põhjal.

Esmalt toimub eeltöötlus 2 minuti jooksul UDG ensüümiga 50 °C juures. Järgneb 12 minutiline denaturatsioon 95 °C juures, mil kaheahelaline DNA sulatatakse üheaheelaliseks. Seejärel korraldatakse kolme etappi 40 tsükli jooksul: denaturatsioon (95 °C, 15 s), praimerite seondumine (58 °C, 30 s) ja DNA süntees (72 °C, 30 s). Iga tsükli lõpus mõõdetakse fluorestsentssignaal, mille põhjal on võimalik arvutada patogeeni DNA koopiate arv.

qPCR-i standardkõvera meetodi teostamiseks kasutati *P. brassicae* genoomset DNA-d standardlahjenduste valmistamiseks. Steriilses destilleeritud vees valmistati *P. brassicae* standardlahus 1×10^6 geenikoopiat/ μ l, millest tehti standardkõvera jaoks vajalik kümnekordsete lahjenduste rida (1×10^6 kuni 1×10^2 geenikoopiat/ μ l). Arvutati geenikoopiate arv DNA lahuse kohta (Valem 1). Viidi läbi qPCR reaktsioon, mille tulemusel registreeritud fluorestsentssignaalide ja läbitsükli väärtuste põhjal saadi standardkõver (Joonis 3).

$$N = \frac{c}{m} \quad (\text{Valem 1}), \text{ kus:}$$

N – geenikoopiate arv (geenikoopiat/l)

c – DNA kontsentratsioon (ng/l)

m – geenifragmendi mass Daltonites (Da), (1 bp = 660 Da)

Na – Avogadro arv ($N_A = 6,022 \times 10^{23}$)

Proovide individuaalse amplifikatsiooni efektiivsuse hindamiseks kasutati programmi LinRegPCR versiooni 2013.0 (Ruijter *et al.* 2009), millega viidi läbi võõrväärtuste eemaldamine (*outlier detection*) – arvutati välja iga proovi amplifikatsiooni efektiivsused ning eemaldati proovid, mille efektiivsuse kõrvalekalle keskmisest oli äärmuslik, $|Z| > 1,96$ (Bar *et al.* 2003).

Iga proovi korduste põhjal arvutati proovi keskmine amplifikatsiooni efektiivsus. Ideaalsetes tingimustes kahekordistub DNA kogus iga qPCR-i amplifikatsioonitsükliga (efektiivsus on 2). LinRegPCR analüüsi järgi jäid uurimisproovide *P. brassicae* ITS regiooni geeni keskmised amplifikatsiooniefektiivsused vahemikku 1,826-1,975. Uuritud patogeeni ITS regiooni geeni koopiaarvud määrati pärast kvaliteedikontrolli, võrreldes proovide amplifikatsiooni tulemusi standardkõveraga. Kõikide uuritud proovide *P. brassicae* geenikoopiaarvud väljendati 1 g algse mullaproovi kohta.

3.5 Andmeanalüüs

Andmeanalüüsid qPCR tulemustele viidi läbi statistikaprogrammis GraphPad Prism 9.0.2 (161), kus kasutati mitteparameetrilist Kruskal-Wallis analüüsi Dunn'i mitmese võrdluse testiga. Analüüsi põhjal selgitati välja, kas töötlusvariandi ja preparaadi kontsentratsioonil on usutav mõju patogeeni kontsentratsioonile mullas. Seose statistilist olulisust iseloomustab p-väärtus, olulisuse nivooks valiti 0,05 ($p < 0,05$). Sealjuures on katsefaktorite mõju võrreldud eraldi mittesteriilses ja steriilses inokuleeritud mullas. Osade proovide tulemus jäeti andmeanalüüsist välja, kuna qPCR reaktsioon ebaõnnestus, mistõttu on lõplik korduste arv töötlusvariantide puhul erinev.

4. TULEMUSED

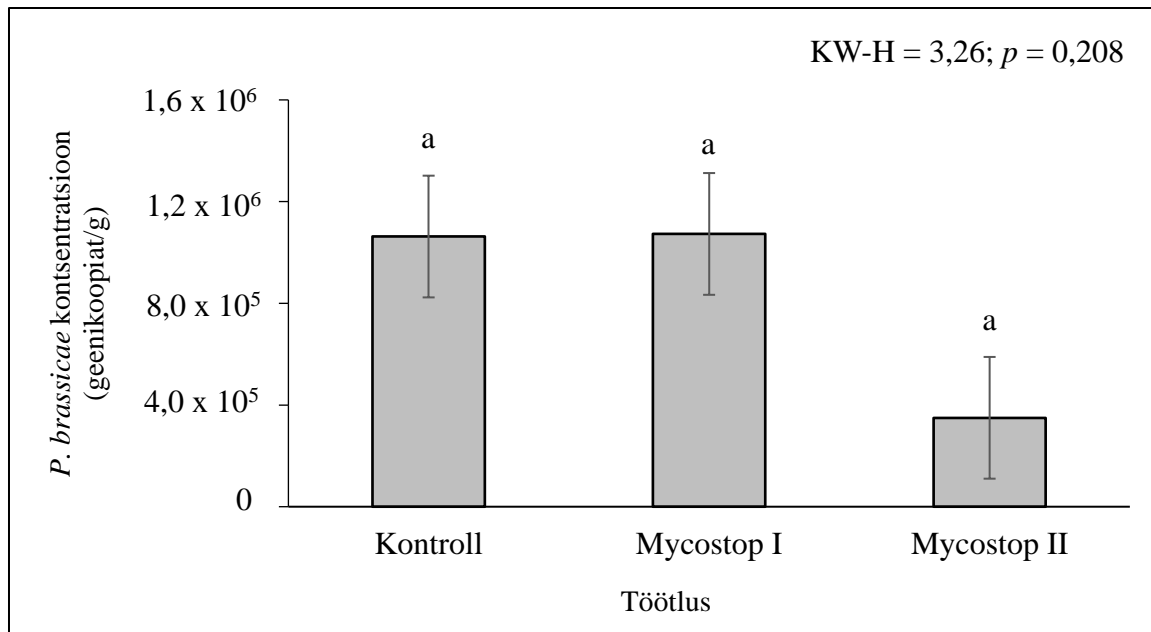
4.1 Patogeeni kontsentratsioon mullaproovides laborikatse lõpus

Katse lõpus määrati patogeeni *P. brassicae* kontsentratsioon igas potis kõikide töötlusvariantide puhul (Tabel 2). Kuigi steriilses mullas esines tendents patogeeni kontsentratsiooni vähenemisele Serenade töötluste puhul, ei esinenud ühegi töötlusvariandi ja kontrollvariandi vahel statistiliselt olulist erinevust ($p>0,05$).

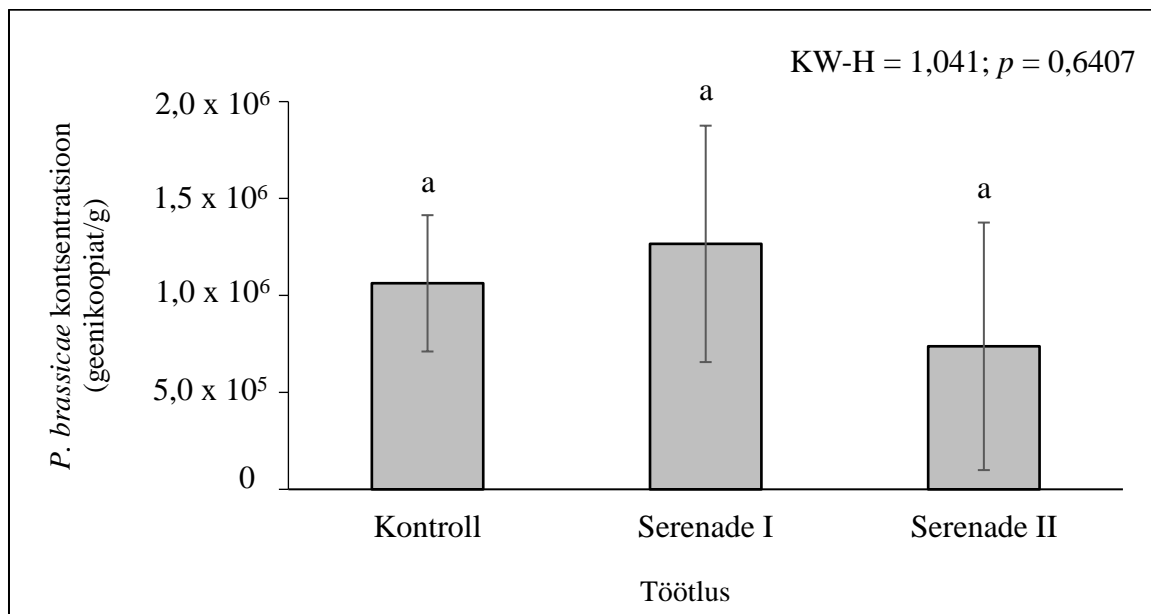
Tabel 2. Patogeeni kontsentratsioon (geenikoopiat/g mullas) ja standardviga katse lõpus erinevates töötlusvariantides.

Töötlusvariant	Steriliseerimata muld		Steriilne muld	
	Keskmine <i>P. brassicae</i> kontsentratsioon	SE	Keskmine <i>P. brassicae</i> kontsentratsioon	SE
Kontroll	1062625	351587	476941	241781
Mycostop I	1072807	567977	595071	313890
Mycostop II	349604	204262	844180	470284
Prestop I	363263	609713	62986	52027
Prestop II	82547	638405	45421	16544
Serenade I	1266101	230726	810244	347023
Serenade II	737600	58812	144971	56033

Kontrollvariandiga võrreldes on *P. brassicae* kontsentratsioon vähenenud steriliseerimata mullaga katses Mycostop II, Serenade II, Prestop I ja II töötlusvariantide puhul (Tabel 2). Patogeeni kontsentratsiooni tõusutendents ilmnas Mycostop I ja Serenade I töötluste puhul, kus oli kasutatud poolekordset tootjapoolset soovitatud kulunormi (Joonis 2 ja 3). Mycostopi ja Serenade töötluste puhul ei ilmnenu statistiliselt olulist erinevust *P. brassicae* kontsentratsioonis töötlusvariantide vahel ja võrdluses kontrollmullaga (Joonis 2 ja 3).

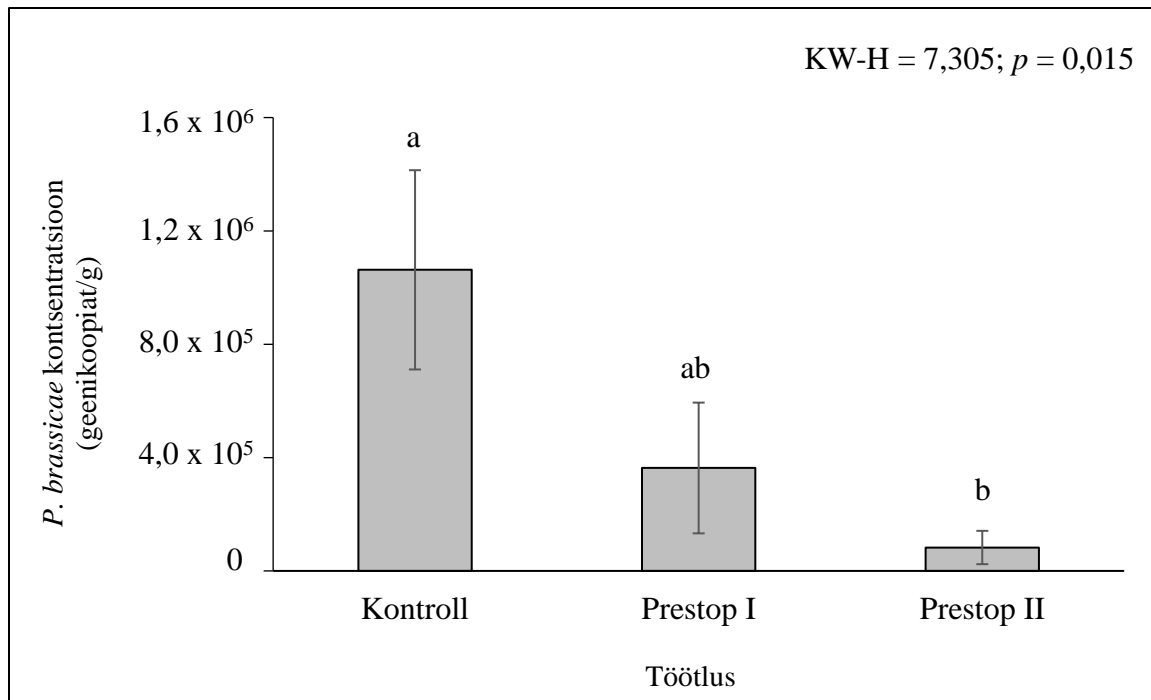


Joonis 2. Patogeeni kontsentratsioon (genikopiat/g mullas) steriliseerimata mullas Mycostopi töötlusvariantides. Joonisel on esitatud keskmised koos standardveaga. Erinevad tähed tähistavad joonisel statistiliselt olulisi erinevusi töötlusvariantide vahel (KW-H, $p < 0,05$).



Joonis 3. Patogeeni kontsentratsioon (genikopiat/g mullas) steriliseerimata Serenade ASO töötlusvariantides. Joonisel on esitatud keskmised koos standardveaga. Erinevad tähed tähistavad joonisel statistiliselt olulisi erinevusi töötlusvariantide vahel (KW-H, $p < 0,05$).

Prestopiga töödeldud steriliseerimata mullaga pottides on patogeeni kontsentratsioon võrreldes kontrollvariandiga vähenenud (Joonis 4), ent statistiliselt oluline erinevus esines vaid kontrollvariandi ja Prestop II töötlusvariandi vahel ($H_{2,13}=7,305$; $p=0,028$).

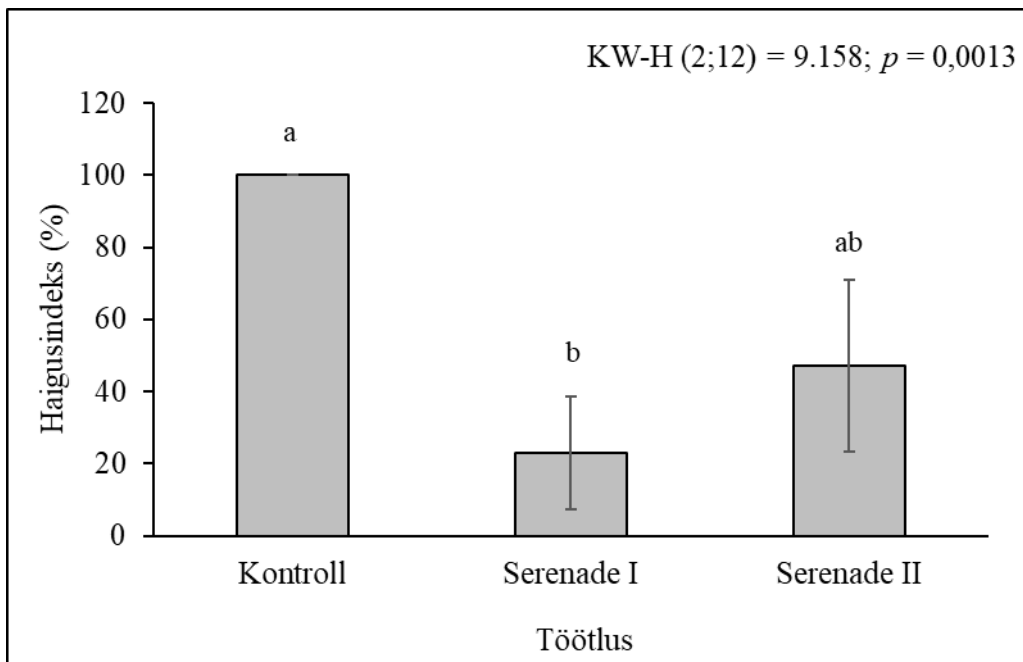


Joonis 4. Patogeeni kontsentratsioon (geenikoopiat/g mullas) steriliseerimata mullas Prestopi töötlusvariantides. Joonisel on esitatud keskmised koos standardveaga. Erinevad tähed tähistavad joonisel statistiliselt olulisi erinevusi töötlusvariantide vahel (KW-H, $p < 0,05$).

Prestop I variandi puhul esines tendents patogeeni kontsentratsiooni vähenemisele proovis. Patogeeni kontsentratsioon Prestop II variandis oli võrreldes kontrollvariandiga vähenenud 92,2% võrra.

4.2 Nakkuse esinemine taimedel

Kõikidel taimedel hinnati sümptomite esinemist etteantud 0–3 skaala järgi (Kuginuki *et al.* 1999) ja arvutati haigusindeks ehk ID väärtus töötlusvariandi kohta (Strelkov *et al.* 2016). Steriilses mullas olid Serenade ASOga töödeldud taimed paremas seisukorras kui teiste töötlusvariantide taimed (ID=75,62–75,93%), ent ühegi preparaadtöötuse puhul statistiliselt olulist erinevust taimede ID väärtustes katsevariantide vahel ja võrdluses kontrolltaimedega ei esinenud. Prestopi ja Mycostopi töötlusvariantide taimedel esines kloroosi ja taimed olid väljaveninud ning kidurad, juurtele olid moodustunud ristõieliste nuutritele omased moodustised. Haigusindeks kontrollvariandis oli 82,74% ning Mycostopi ja Prestopi töötluste haigusindeksid olid >90%.



Joonis 5. Haigusindeks (%) kontrollvariandi ja Serenade ASOga töödeldud taimedel mittesteriilses mullas katse lõpus. Erinevad tähed tähistavad joonisel statistiliselt olulisi erinevusi töötlusvariantide vahel (KW-H, $p < 0,05$).



Joonis 6. Taimede juurtel kujunenud haigussümptomid katse lõpus.

Mittesteriilses loomuliku nakkusega mullas olid kõikide töötlusvariantide taimed kidurad, väiksema kasvuga, lehtedel esines kloroosi ja lillakaid laike. Üksikud taimed pottides olid asümptomaatilised ning üldjuhul need olid õitsemisjärgus. Kõikide katsevariantide taimede juurtele olid moodustunud pahataolised moodustised (Joonis 6), ent Serenade ASOga töödeldud taimede juured olid tervemad ning sümptomid kergemad. Statistiliselt oluline erinevus ilmnes kontrollvariandi taimede ja Serenade ASOga töödeldud taimede vahel ($p=0,0013$). Serenade I ja II töötlusvariantide taimedel oli haigusindeksid teiste katsevariantidega võrreldes madalaimad, vastavalt 22,92% ja 47,22% (Joonis 5).

Kontrollvariandi ja Mycostopi töötlusvariantide puhul oli taimede haigusindeks 100%. Prestop I ja Prestop II töötlusvariantides oli taimede haigusindeksid vastavalt 92,78 % ja 97,04%.

5. ARUTELU JA JÄRELDUSED

Ristõieliste nuutri tõrje on keeruline ning nõuab asjatundlikku ning kompleksset lähenemist. Haigustekitaja *Plasmodiophora brassicae* puhkeosad püsivad mullas pikkade aastate vältel elujõulisena (Wallenhammar 1996), mistõttu peab haigusele vastuvõtlike kultuuride kasvatamisel planeerima külvikorras pikemaid intervale. Keemilised taimekaitsevahendid ei ole suurtel aladel nuutri puhul õigustatud ning teisalt kaasnevad nende kasutamisega olulised riskid mulla tervisele ja keskkonnale (Peng *et al.* 2014). Tõrjevõimaluste piiratuse, rapsi laialdase kasvatamise ja patogeeni virulentsuse suure varieeruvuse tõttu (Diederichsen *et al.* 2014) on nuuter endiselt majanduslikult aktuaalne taimehaigus ning nõuab täiendavaid asjakohaseid jõupingutusi uute tõrjemeetodite välja töötamiseks.

Eestis on bioloogiliste preparaatide nimistus mitmeid mikroobseid fungitsiide, mis on näidustatud mullapatogeenide tõrjeks, ent ristõieliste nuutri vastu on lubatud kasutada ainult biofungitsiidi Prestop. Laialdasemalt on Prestop Eestis kasutusel hahkhallituse tõrjel. Taimekaitsevahendite registris on see näidustatud ka ristõielisi köögivilju kahjustava nuutri tõrjeks nii tunnelites kui ka avamaal (Põllumajandus- ja toiduamet 2020), kuid eelkõige ennetava preparaadina. Prestop sisaldab *Clonostachys rosea* J1446, mis on looduslikult esinev seenetüvi ja mida kasutatakse põllumajanduses laialdaselt mitmete patogeenide, sh *Fusarium* spp., *Pythium* spp. and *Phytophthora* spp. ja *Botrytis* spp. tõrjeks (EFSA 2017).

Käesoleva töö katse tulemused näitasid Prestopi (*C. rosea*) potentsiaali *P. brassicae* kontsentratsiooni vähendamisel nakatunud põllumullas. Prestopi efektiivsust on täheldatud varasemalt mitme mullahaiguse tõrjes kasvuhoonekurkidel (Punja, Yip 2003). Sarnaseid tulemusi on leitud ka *C. rosea* isolaadiga IK726, mis suutis kontrollitud tingimustes vähendada nuutri nakkust rapsi taimedel ja millel on tulevikus potentsiaali välitingimustes katsetamiseks (Andersen *et al.* 2018). Peng *et al.* (2014) leidis, et biofungitsiid Prestop vähendab tõhusalt juurekarvade nakatumist *P. brassicae* poolt. Uuringu tulemustest lähtudes jõuti järeldusele, et Prestopi toimemehhanism on seotud juurte koloniseerimisega ja indutseeritud süsteemse resistentsuse esile kutsumisega taimes. Samuti näitas katse antimikroobsete ainete olemasolu Prestopi koostises (*Ibid.*). Nii Serenade ASO kui ka Prestopiga läbi viidud laborikatses täheldati

nuutrinakkuse vähenemist enam kui 80% ulatuses (Peng *et al.* 2011), mis oli peaaegu samaväärne sünteetiliste pestitsiidide efektiivsusega. Kõrge nakkuse taseme korral olid biofungitsiidid vähem efektiivsed kui fungitsiidid fluasinaam ja tsüasofamiid. Lisaks sellele, leiti põllukatses, et mõlema biofungitsiidi kasutamise järgselt vähenes nakkus umbes 50% võrra hiina kapsal, mida kasvatati kõrge orgaanilise aine sisaldusega mullas (Ibid).

Antud töös teostatud katses ei ilmnenud Serenade ASO nakkust pärssiv toime mullas, ent mittesteriilses loomuliku nakkusega põllumullas kasvanud taimede haigusindeksid oluliselt madalamad, kui teiste biofungitsiidide puhul. Töötlemise järgselt ei kujunenud taimede juurtel tugevaid sümptomeid ja juurepahkasid esines vähem kui Prestopi ja Mycostopiga töödeldud taimedel. Arvatavasti on sellega seotud bakteri poolt eritatavad antibiootilised ained ja indutseeritud resistentsus, kuid rolli võivad mängida ka muud mehhanismid (Lahlali *et al.* 2013). 2011. aastal Kanadas läbi viidud katses täheldati, et Serenade ASOs sisalduv bakter *Bacillus amyloliquefaciens* suutis pärssida nuutri nakkust rapsi juurtel kontrollitud tingimustes, kuid tulemused välitingimustes olid vastuolulised. Kanadas läbi viidud katse autorid järeldasid tulemustest, et biofungitsiid pärssis nakkust tõenäoliselt esmase juurekarvade nakatumise faasis, sest puhkeoste idanemine oli mõjutatud vaid vähesel määral (Peng *et al.* 2011). Vastupidiselt eelnevale, ei avaldanud bakterist valmistatud granuleeritud preparaadid olulist mõju nakkuse tasemele rapsi taimedele põllukatses (Peng *et al.* 2013).

2020. aasta uurimistöös tehti kindlaks 8 uut *Bacillus* perekonna antagonistlikku tüve, mis olid võimelised vähendama ristõieliste nuutri hulka mullas kasvuhoonetingimustes (Zu, He *et al.* 2020). Nendest tüvedest identifitseeriti omakorda kaks potentsiaalset biotõrjetüve – *B. velezensis* F85 and *B. amyloliquefaciens* T113 - millede efektiivsus ulatus üle 80%-ni. Guo jt. (2019) hindasid puuvillataimede risosfäärist isoleeritud tüve *B. subtilis* NCD-2 sobivust nuutri tõrjeks hiina kapsal kasvuhoone tingimustes. *B. subtilis* NCD-2 vähendab nakkuse taset peaaegu 50% võrra, kusjuures haiguse pärssimisel mängivad rolli fengütsiini ühendid (Guo *et al.* 2019). Esmakordselt hinnati risosfäärist isoleeritud bakteri *Bacillus cereus* (MZ-12) toimet ristõieliste nuutri alla surumisel Hiina lehtkapsa pak choi taimedel ning leiti, et isolaadi inhibeeriv toime ületas 70%, suurendades ka taimede biomassi (Arif *et al.* 2020). Autorite hinnangul vähendas *B. cereus* (MZ-12) nakkust otseselt zoosporide elutegevuse pärssimisega ja lisaks ka risosfääri koloniseerimisega.

Käesolevas uurimistöös leiti, et *P. brassicae* kontsentratsioon vähenes mullas oluliselt Prestop´ga töötlemisel, kuid samas oli taimede haigusindeks väga kõrge. Teisalt Serenade ASOga töödeldud mullas *P. brassicae* kontsentratsioon oluliselt ei vähenenud, kuid taimede

haigusindeks oli väiksem kui kontrollvariandi taimedel. See tulemus on vastupidine sellele, et üldiselt on sümptomite raskusastme ja puhkeoste kontsentratsioon mullas omavahel seotud (Murakami 2002) ja puhkeoste kõrge kontsentratsioon soodustab suuremate juurepahkade varasemat moodustumist (Hwang *et al.* 2014). Teisalt on sarnastele järeldustele tulnud Rootsi katses resistentsete rapsisortidega, kus leiti, et geenikoopiate hulk mullas ei korreleerunud haigusindeksiga, vaatamata kõrgele nakkuse tasemele (Wallenhammar *et al.* 2021).

Sarnaselt Serenade ASOle ei ilmnunud käesolevas katses biofungitsiidi Mycostop mõju ristõieliste nuutri allasurumisel mullas ja Mycostopiga töödeldud katsevariandi taimed olid katse lõpus kõige tugevama nakkusega, 100% haigusindeksiga. Biofungitsiid Mycostop, mille koostisesse kuuluvad *Streptomyces* K61 eosed, tõrjub mitmeid seenpatogeenide (*Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., and *Rhizoctonia* spp.) poolt põhjustatud haigusi risosfääri koloniseerimise teel (Minuto *et al.* 2006). *Streptomyces*'i patogeenivastane mehhanism seisneb peamiselt antibiootiliste ainete ja teiste metaboliitide tootmises (Olanrewaju, Babalola 2019) ja seetõttu on *Streptomyces*'i liike laialdaselt uuritud taimehaiguste vastaste biotõrjevahenditena (Chen *et al.* 2016). Erinevalt käesoleva uurimustöö tulemustest vähendasid biofungitsiidid Mycostop (*Streptomyces* K61) ja Actinovate (*S. lydicus* WYEC 108) nuutri nakkust pak choi taimedel kasvuhoonetingimustes, ent ei olnud efektiivsed põllul läbi viidud katsetes (Adhikari 2010). Teisalt oli kasvuhoonekatsetes biofungitsiidide efektiivsus tugeva nakkuse korral madal (*Ibid*). Samuti vähendas Mycostop nakatunud rapsil haigusindeksit 61% võrra kasvuhoonekatses, ent selle efektiivsus oli väiksem kui Prestopi ja Serenade ASO puhul (Peng *et al.* 2011). Sarnaselt eelnevale uuringule, ei ilmnunud biofungitsiididel olulist haigust pärssivat toimet tugeva nakkuse korral (*Ibid.*). On leitud ka, et *Streptomyces* sp. isolaat S99 vähendas nuutrinakkust hiina kapsal nii põllu- kui ka kasvuhoonetingimustes (Cheah *et al.* 2001) ning *Streptomyces platensis* isolaat 3-10 on efektiivne bioloogiline tõrjevahend ristõieliste nuutri tõrjeks (Shakeel *et al.* 2016).

Käesoleva katse tulemused näitasid, et steriilses mullas ei mõjunud ükski preparaat patogeeni kontsentratsiooni vähendavalt. Siinkohal arvab töö autor, et mulla kuumtöötlemise tagajärjel hukkus ka muu mullaelustik ning biofungitsiidi toimeaine ei suutnud üksinda patogeeni elutegevust mullas pärssida. Kuumtöötlemise hukutavat mõju mulla mikroorganismidele täheldati ka Carter *et al.* (2007) uuringus. Muld on kompleksne keskkond, kus mullaorganismide vahel leiavad aset keerulised interaktsioonid. Elutsükli jooksul suudab *P. brassicae* luua sidemed mullas, risosfääris ja juurtes paiknevate mikroobidega ning mulla

mikroobide mitmekesisuse tase avaldab mõju patogeeni kogusele ja haiguse arengule mullas (Daval *et al.* 2020).

Biopestitsiidide efektiivsust kindlas kohas ja kindlal ajal võivad mõjutada mitmed tegurid, sh nende mikrobioloogiline koostis kui ka töödeldav substraat (Lengai, Muthomi 2018). Eelkõige mõjutab biofungitsiidide efektiivsust nendes sisalduvate antagonistlike organismide toimeviis. Serenade ASO (*B. amyloliquefaciens*) toimemehhanism seisneb tõenäoliselt antibioosis ja indutseeritud resistentsuse esilekutsumises (Lahlali *et al.* 2013). Arvatakse, et biofungitsiid Serenade ASO takistab haiguse arengut esmase ja teisese infektsiooni staadiumis zoosporide moodustumise ajal ning selle efektiivsus tuleneb antibiootikumide ja pindaktiivsete ainete mõjust ülitundlikele zoosporidele (Lahlali *et al.* 2011). Preparaadis sisalduvad bakteriaalsed metaboliidid, nt lipopeptiidid, võivad kaasa aidata toimeaine risosfääri koloniseerimisel ja vähendades konkurentsi teiste mulla mikroobide poolt (*Ibid.*).

Prestopis sisalduv *C. rosea* takistab haiguse arengut juurte koloniseerimise teel ja indutseeritud vastupanuvõimet esilekutsumisega taimes (Peng *et al.* 2014). Enamikes biotõrjevahendeid hõlmavates süsteemides on toimeaine risosfääri koloniseerimise võime oluline preparaadi efektiivsust määrav tegur (Yang *et al.* 2009; Begum *et al.* 2010). Indutseeritud resistentsuse esilekutsumine võib toimuda seene tekitatud fenüülpropanoidi ja jasmoonhappe/etüleen metaboolsete radade moduleerimise kaudu (Peng *et al.* 2014). Esmast ja sekundaarsed nakatumist võivad otseselt pärssida seene lüütilised ensüümid ja antibiootilised ained ja/või preparaadi lisaained, soodustades samas risosfääri kiiret koloniseerimist seene poolt ja pärssides teisi mikroobseid konkurente mullas (*Ibid.*).

Teine faktor, millel võib olla oluline mõju biofungitsiidide efektiivsusele, on preparaatide manustamise viis ja aeg. 2014. aasta uuringu autorid rõhuvad vajadusele säilitada mullas kõrge biofungitsiidide kontsentratsioon patogeeni elutsükli esmase ja teisese nakkuse perioodil (Peng *et al.* 2014). Seda toetab fakt, et zoosporid on võrreldes püsieostega haprad ja lühiealised (Dixon 2006), mistõttu peaks haiguse tõrje olema suunatud just elutsükli sellele osale, kus zoosporid on aktiivsed. Optimaalsetes tingimustes toimub zoosporide moodustumine 7–14 päeva pärast esmakordset kokkupuudet patogeeninga (Sharma *et al.* 2011), mistõttu leiab ka katsetes biofungitsiididega töötlemine aset võimalikult varakult (Gossen *et al.* 2013), kuid mitte enam siis, kui juurtes on moodustunud patogeeni plasmoodiumid (Peng *et al.* 2011).

Antud katses kasteti katsepottide mulda biofungitsiidi vastavalt tootjapoolsetele juhistele. Rapsitaimedega läbi viidud katses kontrollitud keskkonnas leiti, et mulla kastmine

biofungitsiididega oli tõhusam kui seemnete puhtimine (Peng *et al.* 2011). Vaatamata sellele, ei ole põllul rapsitaimede töötlemine kastmisveega otstarbekas, kuna see oleks suurtel pindadel liiga ressursikulukas. Seetõttu on ainsad praktilised võimalused nuutri tõrjumiseks rapsil seemnete või reavahede töötlemine biofungitsiidiga (Peng *et al.* 2014). Efektiivsuse optimeerimiseks on köögiviljade puhul soovituslik manustada biofungitsiidi kastmisveega või töödelda preparaadiga ümberistutamise eelselt seemikute juuri, et taimede juurestik saaks toimeainega põhjalikult läbi immutatud (Gossen *et al.* 2013b). Ettekasvatatud köögiviljade puhul soovitatakse biofungitsiididega taimi töödelda juba varajases arengustaadiumis, et enne põllule istutamist suudaksid biofungitsiidi toimeained koloniseerida taime juurekava (Peng *et al.* 2014).

Eeltoodud tegureid arvesse võttes võib teha järeldusi katses kasutatud biofungitsiidide efektiivsuse varieeruvuse kohta. Kuna katsetingimused olid kõikide töötluste puhul samasugused, ei saa tulemused olla mõjutatud mullatüübist, keskkonnatingimustest või biofungitsiidide manustamise viisist. Küll aga on tõenäoline, et biofungitsiidide toime on mõjutatud konkreetse antagonistliku organismi patogeenvastasest toimemehhanismist, mis iga katses kasutatud preparaadi koostisaine puhul oli erinev. Efektiivne bioloogiline tüvi peab olema võimeline koloniseerima taimeosaid ja nendel paljunema (Shafique *et al.* 2016). Antagonistlike seente või bakterite varieeruv efektiivsus võib seisneda ebapiisavas koloniseerimisvõimes, vastuvõtlikkuses keskkonnatingimuste suhtes ja muutlikus võimekuses toota patogeenvastaseid ainevahetusprodukte (Weller 2002). On võimalik, et võrreldes bakteritega *B. amyloliquefaciens* ja *Streptomyces* K61 suutis seeneliik *C. rosea* katses paremini koloniseerida taimede juured ning mulla ja stimuleerida taime kaitsemehhanisme konkreetsetes tingimustes. Mitmetes uuringutes on antagonistlikud mikroorganismid andnud mullapatogeenide allasurumisel lootustandvaid tulemusi (Li *et al.* 2020; Caulier *et al.* 2018), ent paljudel juhtudel on tulemused olnud vastuolulised, sest kindel mikrobioloogiline toimeagent ei pruugi erinevates risosfäärides või põllumajanduslikes agroökosüsteemides käituda ühtemoodi (Raupach, Kloepper 1998). Küll aga on *P. brassicae* ja teiste mikroorganismide vahel täheldatud omavahelisi interaktsioone: mõned mikroobid suudavad *P. brassicae* arengut piirata ja nende poolt toodetud metaboliidid pärsvad patogeeni ainevahetuslikku aktiivsust (Einhorn *et al.* 1991).

Biofungitsiidide Mycostop ja Serenade ASO efektiivsust võisid mõjutada ka algne nakkuse tase ja mulla happesus. Katses kasutatud põllumuld oli tugevalt happelise reaktsiooniga (pH 4,48) ning mulla puhkeoste algne kontsentratsioon oli 6 miljonit geenikoopiat 1 grammi mulla

kohta, mis viitab väga tugevale nakkusele. Nii mulla madal pH, mis soodustab nakkuse arengut (Murakami *et al.* 2002) kui ka kõrge *P. brassicae* kontsentratsioon, võisid olla põhjuseks, miks Mycostop ja Serenade ASO ei olnud efektiivsed ristõieliste nuutri vastu. Ka varasemad uuringud (Peng *et al.* 2011; Adhikari 2010) on näidanud, et biofungitsiidide efektiivsus kõrge nakkuse korral on madalam.

Integreeritud taimekaitse (ingl *integrated pest management*) on nüüdseks aktsepteeritud praktika vähendamaks sõltuvust sünteetilisest taimekaitsevahenditest, mille üks põhikomponente on kasulike mikroorganismide kasutamine biotõrjes (Chandler *et al.* 2011; Marian, Shimizu 2019). Kuid biofungitsiidide madal efektiivsus ristõieliste nuutri kõrge nakkuse korral viitab sellele, et neid tuleks kasutada integreeritud tõrje ühe komponendina, mitte iseseisva meetmena (Donald *et al.* 2006). Biofungitsiidid ei peaks asendama olemasolevaid tõrjemeetmeid, vaid olema kaasatud ristõieliste nuutri tõrjestrategiasse, et ennetada nakkuse levikut ja süvenemist põllul koos resistentsete sortide kasvatamisega ja viljavahelduse rakendamisega.

KOKKUVÕTE

Ristõieliste nuuter põhjustab taimehaigust, mis kahjustab kõiki ristõielisi kultuure ja võib kaasa tuua väga suuri saagikadusid. Nakatunud põllul on haigusest raske vabaneda, kuna patogeen on vastupidav erinevatele keskkonnatingimustele ja püsib mullas aastaid nakatumisvõimelisena. Ainsad toimivad nakkuse levikut pidurdavad tõrjemeetmed on resistentsete sortide kasvatamine ja külvikorra jälgimine, sest efektiivsed sünteetilised taimekaitsevahendeid ristõieliste nuutri tõrjumiseks puuduvad. Alternatiivina on uuritud mikroobseid biofungitsiide, mis on andnud häid tulemusi mitmete taimepatogeenide tõrjes.

Tõrjemeetmete piirastusest lähtuvalt oli käesoleva magistr töö eesmärgiks hinnata kaubanduslike biofungitsiidide – Mycostop, Prestop, Serenade ASO - mõju ristõieliste nuutri tekitaja *Plasmodiophora brassicae* hulga vähenemisele põllumullas, kus kasvas patogeenile vastuvõtlik rapsisort.

Töös püstitatud algne hüpotees leidis osaliselt kinnitust. Magistr töö tulemustest selgub, et biofungitsiid Prestop (*Clonostachys rosea*) vähendas *P. brassicae* kontsentratsiooni loomuliku nakkusega põllumullas. Statistiliselt oluline erinevus esines Prestopi töötlusvariandiga, kus kasutati tootjapoolset soovitatud ühekordset kulunormi. Selle tulemusena vähenes patogeeni kontsentratsioon nakatunud mullas 92% võrra. Biofungitsiidid Mycostop ja Serenade ASO ei olnud efektiivsed ristõieliste nuutri tõrjumisel, ent Serenade ASOga töötlemise järgselt vähenes taime haigusindeks ehk nähtavad sümptomid taimedel olid nõrgemad.

Autori hinnangul võis biofungitsiidide efektiivsuse varieeruvuse põhjustada eelkõige nendes sisalduvate mikroorganismide erinev toimemehhanism. Antagonistlike organismide madal efektiivsus patogeeni elutegevuse pärssimisel võib olla põhjustatud taime ebapiisavas koloniseerimisvõimes või suutmatuses toota piisaval määral patogeenivastaseid ainevahetusprodukte. Teisalt võis mulla väga kõrge happesus biofungitsiidide efektiivsust pärssida, ja samas soodustada patogeeni elutegevust.

Antud uurimistöö tulemuste põhjal võib järeldada, et biofungitsiid Prestop võiks olla kaasatud ristõieliste nuutri integreeritud tõrjesse. Täpsemate järelduste tegemiseks tuleb läbi viia täiendavaid katseid biofungitsiidiga Prestop nii labori- kui ka põllutingimustes.

Tulevikus võiks olla võimalus mõne teadusprojekti raames isoleerida Eesti põllumuldadest kohaliku päritoluga antagonistlikke seene- või bakteritüvesid, mida katsetada *P. brassicae* tõrjeks. See võib suurendada bioloogilise tõrje efektiivsust, kuna antagonistlikud organismid pärineksid siinsetest muldadest ja on seega kohastunud kohalike mulla- ja kliimatingimustega.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adhikari K.K.C.** (2010). Effect of temperature, biofungicides and fungicides on clubroot of selected Brassica crops. [Magistritöö]. Guelph (ON): University of Guelph.
- Al-Daoud, F., Gossen, B.D. and McDonald, M.R.** (2020). Maturation of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* continues after host cell death. – *Plant Pathology*. Vol. 69, pp. 310-319.
- Andersen, C. B., Jørgensen, H. J. L., Manzotti, A., & Jensen, B.** (2018). Seed coating with the fungal biocontrol agent *Clonostachys rosea* controls clubroot in oilseed rape. – *IOBC-WPRS Bulletin*, Vol. 136, pp. 157-163.
- Auer, S., Ludwig-Müller, J.** (2015). Biological control of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) by the endophytic fungus *Acremonium alternatum*. – *Journal of Endocytobiosis and Cell Research*. Vol. 26, pp. 43-49.
- Bar, T., Ståhlberg, A., Muszta, A., Kubista, M.** (2003). Kinetic Outlier Detection (KOD) in real-time PCR. – *Nucleic Acids Research*. Vol. 31 pp. e105.
- Begum, M.M., Sariah, M., Puteh, A.B., Zainal Abidin, M.A., Rahman MA, Siddiqui, Y.** (2010). Field performance of bioprimes seeds to suppress *Colletotrichum truncatum* causing damping-off and seedling stand of soybean. – *Biological Control*. Vol. 53, pp. 18–23.
- CABI.** (2019). Invasive Species Compendium. Datasheet: *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/41865> (25.03.2021).
- Carter, D., Yellowlees, D., Tibbett, M.** (2007). Autoclaving kills soil microbes yet soil enzymes remain active. – *Pedobiologia*. Vol. 51, pp. 295-299.
- Caulier S., Gillis A., Colau G., Licciardi F., Liépin M., Desoignies N., Modrie P., Legrève A., Mahillon J., Bragard C.** (2018). Versatile antagonistic activities of soil-borne *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against *Phytophthora infestans* and other potato pathogens. – *Frontiers in Microbiology*. Vol. 13, No. 9, pp. 143.
- Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P.** (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. – *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. Vol. 366, No. 1573, pp. 1987–1998.
- Cheah, L-H, G. Kent, and S. Gowers.** (2001). Brassica crops and a *Streptomyces* sp. as potential biocontrol for clubroot of brassicas. – *New Zealand Plant Protection*. Vol. 54, pp. 80–83.
- Chen, Y.Y., Chen, P.C., Tsay, T.T.** (2016). The biocontrol efficacy and antibiotic activity of *Streptomyces plicatus* on the oomycete *Phytophthora capsici*. – *Biological Control*, Vol. 98, pp. 34-42.

- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., Barka, E.A.** (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. – *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, pp. 4951–4959.
- Conrath, U., Beckers, G.J., Langenbach, C.J., Jaskiewicz, M.R.** (2015). Priming for enhanced defense. – *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 53, pp. 97–119.
- Cook, R.J., Baker K.F.** (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Czajka, A., Markiewicz, M., Kowalska, B., Smolińska, U.** (2020). Reaction of clubroot-resistant genotypes of *Brassica rapa*, *Brassica napus* and *Brassica oleracea* to Polish *Plasmodiophora brassicae* pathotypes in laboratory tests. – *European Journal of Plant Pathology*, Vol. 158, pp. 533–544.
- Czubatka-Bieńkowska A, Kaczmarek J, Marzec-Schmidt K, Nieróbca A, Czajka A, Jędrzycka M.** (2020). Country-Wide qPCR Based Assessment of *Plasmodiophora brassicae* Spread in Agricultural Soils and Recommendations for the Cultivation of Brassicaceae Crops in Poland. – *Pathogens*. Vol. 9, No. 12, pp. 1070.
- Daval, S., Gazengel, K., Belcour, A., Linglin, J., Guillerme-Erckelboudt, A., Sarniguet, A., Manzanares-Dauleux, M., Lebreton, L., Mougel, C.** (2020). Soil microbiota influences clubroot disease by modulating *Plasmodiophora brassicae* and *Brassica napus* transcriptomes. – *Microbial Biotechnology*. Vol. 13. No. 5, pp. 1648– 1672.
- Deora, A, Gossen, B. D., Walley, F., McDonald, M. R.** (2011). Boron reduces development of clubroot in canola. – *Canadian Journal of Plant Pathology*, Vol. 33, No. 4, pp. 475-484.
- Deora, A., Gossen, B., McDonald, M. R., Ruth, M.** (2013). Cytology of infection, development and expression of resistance to *Plasmodiophora brassicae* in canola. – *Annals of Applied Biology*. Vol. 163, pp. 56-71.
- Deora, A., Gossen, B.D. and McDonald, M.R.** (2012). Infection and development of *Plasmodiophora brassicae* in resistant and susceptible canola cultivars. – *Canadian Journal of Plant Pathology*. Vol. 34, pp. 239-247.
- Diederichsen E., Deppe U., Sacristán M.D.** (2003): Characterization of clubroot resistance in recent winter oilseed rape material. In: Proceedings 11th International Rapeseed Congress, July 6–10, 2003, Copenhagen, Denmark: pp. 68–70.
- Diederichsen E., Frauen M., Ludwig-Müller J.** (2014): Clubroot disease management challenges from a German perspective. – *Canadian Journal of Plant Pathology*. Vol. 36, pp. 85–98.
- Diederichsen, E., Dixon, G.R., Wallenhammar, A.C.** (2016). Special issue on clubroot and blackleg diseases of brassicas - Foreword. – *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 145, pp. 515–516.
- Dixon, G.R.** (2006) The biology of *Plasmodiophora brassicae* Wor.—a review of recent advances. – *Acta Horticulture*. Vol. 706, pp. 271–282.

- Dixon, G.R.** (2009a). The occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease. – *Journal of Plant Growth Regulation*. Vol.28, No.3, pp. 194–202.
- Dixon, G.R.** (2009b). *Plasmodiophora brassicae* in its environment. – *Journal of Plant Growth Regulation*. Vol. 28, pp. 212–228.
- Dixon, G.R.** (2014). Clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin)—An agricultural and biological challenge worldwide. – *Canadian Journal of Plant Pathology*. Vol. 23, pp. 5–18.
- Donald, C., Porter, I.** (2009). Integrated control of clubroot. – *Journal of Plant Growth Regulation*. Vol. 28, pp. 289–303.
- Donald, E.C., Porter, I.J., Faggian, R., Lancaster, R.A.** (2006). An integrated approach to the control of clubroot in vegetable *Brassica* crops. – *Acta Horticulturae*. Vol. 706, pp. 283– 300.
- Eestis turule lubatud taimekaitsevahendid.** Põllumajandus- ja toiduamet. <https://portaal.agri.ee> (18.04.2021)
- Einhorn, G., Bochow, H., Huber, J., Krebs, B.** (1991). Methodological studies on the detection of antagonists of the clubroot pathogen *Plasmodiophora brassicae* Wor. – *Archive für Phytopathologie und Pflanzenschutz*. Vol. 27, pp. 205–208.
- Ernst, T.W., Kher S, Stanton D, Rennie DC, Hwang SF, Strelkov SE.** (2019). *Plasmodiophora brassicae* resting spore dynamics in clubroot resistant canola (*Brassica napus*) cropping systems. – *Plant Pathology*. Vol. 68, pp. 399–408.
- European Food Safety Authority (EFSA), Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Bellisai, G., Brancato, A., Brocca, D., Bura, L., Byers, H., Chiusolo, A., Court Marques, D., Crivellente, F., De Lentdecker, C., De Maglie, M., Egsmose, M., Erdos, Z., Fait, G., Ferreira, L., Goumenou, M., Greco, L., ... Villamar-Bouza, L.** (2017). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Clonostachys rosea* strain J1446 (approved in Regulation (EU) No 540/2011 as *Gliocladium catenulatum* strain J1446). EFSA journal. - *European Food Safety Authority*. Vol. 15, No. 7. e04905.
- Fähling, M., Graf, H., Siemens, J.** (2003). Pathotype Separation of *Plasmodiophora brassicae* by the Host Plant. – *Journal of Phytopathology*. Vol. 151, pp. 425–430.
- Glick, B.R.** (2020). Beneficial Plant-Bacterial Interactions (2nd ed.), Springer, Heidelberg.
- Gossen, B. D., Kasinathan, H., Cao, T., Manolii, V. P., Strelkov, S. E., Hwang, S.F., McDonald, M. R.** (2013a). Interaction of pH and temperature affect infection and symptom development of *Plasmodiophora brassicae* in canola. – *Canadian Journal of Plant Pathology*. Vol. 35, pp. 294–303.
- Gossen, B.D., Adhikari, K.K.C., McDonald, M.R.** (2012). Effect of seeding date on development of clubroot in short-season *Brassica* crops. – *Canadian Journal of Plant Pathology*. Vol. 34, No. 4, pp. 516–523.

- Gossen, B.D., Kasinathan, H., Deora, A., Peng, G., McDonald, M.R.** (2016). Effect of soil type, organic matter content, bulk density and saturation on clubroot severity and biofungicide efficacy. – *Plant Pathology*. Vol. 65. pp. 1238-1245.
- Gossen, B.D., McDonald, M.R., Hwang, S.F., Strelkov, S.E. Peng, G.** (2013b). A comparison of clubroot development and management on canola and Brassica vegetables. – *Canadian Journal of Plant Pathology*, Vol. 35, No. 2, pp. 175-191.
- Handelsman, J., Stabb, E.V.** (1996). Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. – *The Plant Cell*, Vol. 8, pp. 1855-1869.
- Hittorf, M., Letsch-Praxmarer, S., Windegger, A., Bass, D., Kirchmair, M. and Neuhauser, S.** (2020). Revised Taxonomy and Expanded Biodiversity of the Phytomyxea (Rhizaria, Endomyxa). – *Journal of Eukaryotic Microbiology*. Vol. 67, pp. 648-659.
- Hwang, S. F., Cao, T., Xiao, Q., Ahmed, H. U., Manolii, V. P., Turnbull, G. D., Gossen, B. D., Peng, G., Strelkov, S.E.** (2012). Effects of fungicide, seeding date and seedling age on clubroot severity, seedling emergence and yield of canola. – *Canadian Journal of Plant Science*. Vol. 92, No.6, pp. 1175-1186.
- Hwang, S.F., Ahmed, H.U., Strelkov, S.E., Gossen, B.D., Turnbull, G.D., Peng, G., Howard, R.J.** (2011). Seedling age and inoculum density affect clubroot severity and seed yield in canola – *Canadian Journal of Plant Science*. Vol. 91, No. 1, pp. 183-190.
- Hwang, S.F., Ahmed, H.U., Zhou, Q., Strelkov, S.E., Gossen, B.D., Peng, G., Turnbull G.D.** (2011b). Influence of cultivar resistance and inoculum density on root hair infection of canola (*Brassica napus*) by *Plasmodiophora brassicae*. – *Plant Pathology*. Vol. 60, pp. 820–829.
- Hwang, S.F., Howard, R., Strelkov, S., Gossen, B., Peng, G.** (2014). Management of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola (*Brassica napus*) in western Canada. – *Canadian Journal of Plant Pathology*. Vol. 36, pp. 49–65.
- Jedryczka, M., Kasprzyk, I., Korbas, M., Jajor, E., Kaczmarek, J.** (2014). Infestation of Polish agricultural soils by *Plasmodiophora brassicae* along the Polish-Ukrainian border. – *Journal of Plant Diseases and Protection*. Vol. 54, pp. 238–241.
- Kachhawa, D.** (2017). Microorganisms as Biopesticides. – *Journal of Entomology and Zoology Studies*. Vol. 3, pp. 468-473.
- Kageyama K, Asano T.** (2009). Life cycle of *Plasmodiophora brassicae*. – *Journal of Plant Growth Regulation*. Vol. 28, pp. 203–211.
- Kuginuki, Y., Yoshikawa, H., and Hirai, M.** (1999). Variation in virulence of *Plasmodiophora brassicae* in Japan tested with clubroot-resistant cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). – *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 105, pp. 327-332.
- Kumar. S.** (2012). Biopesticides: A Need for Food and Environmental Safety. – *Journal of Biopesticides*. Vol. 3, No. 4. e107.

- Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg W.J.** (2019). Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. – *Frontiers in Plant Science*. Vol. 10, pp. 845.
- Lahlali, R., Peng, G., Gossen, B.D., McGregor, L., Yu, F.Q., Hynes, R.K., Hwang, S.F., McDonald, M.R., Boyetchko, S.M.** (2013). Evidence that the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis*) suppresses clubroot on canola via antibiosis and induced host resistance. – *Phytopathology*. Vol. 103, No. 3, pp. 245-254.
- Lahlali, R., Peng, G., McGregor, L., Gossen, B. D., Hwang, S. F., and McDonald, M. R.** (2011). Mechanisms of the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis* QST713) in suppressing clubroot. – *Biocontrol Science and Technology*. Vol. 21, pp. 1351-1362.
- Laila, R., Robin, A. H., Yang, K., Choi, G. J., Park, J. I., Nou, I. S.** (2017). Detection of Ribosomal DNA Sequence Polymorphisms in the Protist Plasmodiophora brassicae for the Identification of Geographical Isolates. – *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 18, No.1, pp. 84.
- Law, J. W.F., Ser, H.L., Khan, T.M., Chuah, L.H., Pusparajah, P., Chan, K.G., Goh, B.H., Lee, L.H.** (2017). The Potential of *Streptomyces* as Biocontrol Agents against the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). – *Frontiers in Microbiology*, Vol.8, pp. 3.
- Lengai, G., Muthomi, J.W.** (2018). Biopesticides and Their Role in Sustainable Agricultural Production. – *Journal of Biosciences and Medicines*. Vol. 6. pp. 7-41.
- Li, J., Philp, J., Li, J., Wei, Y., Li, H., Yang, K., Ryder, M., Toh, R., Zhou, Y., Denton, M.D., Hu, J., Wang, Y.** (2020). *Trichoderma harzianum* Inoculation Reduces the Incidence of Clubroot Disease in Chinese Cabbage by Regulating the Rhizosphere Microbial Community. – *Microorganisms*. Vol. 31, No. 8(9), pp. 1325.
- Liu, Y., Xu, A., Liang, F., Yao, X., Wang, Y., Liu, X., Zhang Y., Dalelhan, J., Zhang, B., Qin M., et al.** (2018b). Screening of clubroot-resistant varieties and transfer of clubroot resistance genes to *Brassica napus* using distant hybridization. – *Breeding Science*. Vol. 68, pp. 258–267.
- Ludwig-Müller, J.** (1999). *Plasmodiophora brassicae*, the causal agent of clubroot disease: a review on molecular and biochemical events in pathogenesis. – *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. Vol. 106, pp. 109–127.
- Manzanares-Dauleux, M.J., Rocherieux, J., Alix, K., Glory, P., Giboulot, A., Lariagon, C., et al.** (2006). Deciphering the host mechanisms of resistance in the Brassicaceae/*Plasmodiophora brassicae* pathosystem. – *Acta Horticulturae*. Vol. 706, pp. 317–322.
- Marian, M., Shimizu, M.** (2019). Improving performance of microbial biocontrol agents against plant diseases. – *Journal of General Plant Pathology*. Vol. 85, pp. 329–336.
- Minuto, A, D. Spadaro, A. Garibaldi, M.L. Gullino.** (2006). Control of soil borne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. – *Crop Protection*. Vol. 25, pp. 468-475.

- Muirhead, K., Todd, C., Wei, Y., Bonham-Smith, P., Pérez-López, E.** (2020). ClubrootTracker: A Resource to Plan a Clubroot-Free Farm. – *Plant Health Progress*. Vol. 21. pp. 185-187.
- Murakami, H., Tsushima, S., Kuroyanagi, Y. and Shishido, Y.** (2002). Reduction of resting spore density of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease severity by liming. – *Soil Science and Plant Nutrition*. Vol. 48, No. 5, pp. 685–691.
- O'Brien, P.** (2017). Biological control of plant diseases. – *Australasian Plant Pathology*. Vol. 46. pp. 4.
- Olanrewaju, O.S., Babalola, O.O.** (2019). *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. – *Applied Microbiology Biotechnology*. Vol. 103, pp. 1179–1188.
- Pal, K.K., McSpadden Gardener, B.** (2006). Biological Control of Plant Pathogens. – *The Plant Health Instructor*. Vol. 2.
- Pageau, D., Lajeunesse, J., Lafond, J.** (2006). Impact de l'hernie des crucifères [*Plasmodiophora brassicae*] sur la productivité et la qualité du canola. – *Canadian Journal of Plant Pathology*. Vol. 28, pp.137–143.
- Peng, G., Lahlali, R., Hwang S.F, Pageau D, Hynes, R.K, McDonald, M.R, Gossen, B.D, Strelkov S.E.** (2014). Crop rotation, cultivar resistance, and fungicides/biofungicides for managing clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola. – *Canadian Journal of Plant Pathology*. Vol. 36, pp. 99–112.
- Peng, G., Lahlali, R., Hynes, R.H., Gossen, B.D., Falk, F.C., Yu, F., Boyetchko, S.M., McGregor, L., Pageau, D., Anderson, K., Hwang, S.F., Strelkov, S.E., McDonald, M.R., Turkington, T.K.** (2013). Assessment of crop rotation, cultivar resistance and *Bacillus subtilis* biofungicide for control of clubroot on canola. – *Acta Horticulturae*. Vol. 1005, pp. 591-598.
- Peng, G., McGregor, L., Lahlali, R., Gossen, B.D., Hwang, S.F., Adhikari, K.K., Strelkov, S.E. and McDonald, M.R.** (2011). Potential biological control of clubroot on canola and crucifer vegetable crops. – *Plant Pathology*, Vol. 60, pp. 566-574.
- Pertot, I., Alabouvette, C., Esteve, E. H., and Franca, S.** (2015). Mini-paper: The use of microbial biocontrol agents against soil-borne diseases. The Agricultural European Innovation Partnership. http://ec.europa.eu/eip/agriculture/sites/agri-eip/files/8_eip_sbd_mp_biocontrol_final.pdf (31.03.2021)
- PM0281: PÕLLUMAJANDUSMAA JA -KULTUURID MAAKONNA JÄRGI.** (uuendatud 22.02.2021) Eesti Statistika Andmebaas. <https://andmed.stat.ee/> (20.04.2021)
- Punja, Z., Yip, R.** (2003). Biological control of damping-off and root rot caused by *Pythium aphanidermatum* on greenhouse cucumbers. - *Canadian Journal of Plant Pathology* Vol. 25, No.4, pp. 411-417.
- Raaijmakers, J., Mazzola, M.** (2012). Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by Beneficial and Plant Pathogenic Bacteria. – *Annual Review of Phytopathology*. Vol.50. pp. 403-424.

- Raupach G.S., Kloepper J.W.** (1998). Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. – *Phytopathology*. Vol. 88, No.11, pp. 1158–1164.
- Říčařová V., Kazda J., Singh K., Ryšánek P.** (2016). Clubroot caused by *Plasmodiophora brassicae* Wor.: a review of emerging serious disease of oilseed rape in the Czech Republic. – *Plant Protection Science*, Vol. 52, pp. 71-86.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M., Moorman, A.F.M.** (2009). Amplification Efficiency: Linking Baseline and Bias in the Analysis Of Quantitative PCR Data. – *Nucleic Acids Research*. Vol. 37. e45.
- Shafique, H.A.; Sultana, V.; Ehteshamul-Haque, S.; Athar, M.** (2016). Management of soil-borne diseases of organic vegetables. – *Journal of Plant Protection Research*. Vol. 56, pp. 221–230.
- Shakeel, Q., Lyu, A., Zhang, J., Wu, M., Chen, S., Chen, W., Li, G., Yang, L.** (2016). Optimization of the cultural medium and conditions for production of antifungal substances by *Streptomyces platensis* 3-10 and evaluation of its efficacy in suppression of clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae*) of oilseed rape. – *Biological Control*. Vol. 101.
- Sharma, K., Gossen, Br., Mcdonald, M. R.** (2011). Effect of temperature on primary infection by *Plasmodiophora brassicae*. – *Plant Pathology*. Vol. 60. pp. 830-838.
- Song, C.H., Islam, R.M.D., Jeong, Y.T. and Lee, Y.S.** (2012). Isolation and Identification of Antifungal Compounds from *Bacillus subtilis* c9 Inhibiting the Growth of Plant Pathogenic Fungi. – *Mycobiology*, Vol. 1, pp. 59-66.
- Spadaro, D., Droby, S.** (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. – *Trends in Food Science & Technology*. Vol.47, pp. 39-49.
- Stenberg, J.A., Sundh, I., Becher, P.G. et al.** (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. – *Journal of Pest Science*.
- Strehlow, B., de Mol, F., Struck, C.** (2015). Risk Potential of Clubroot Disease on Winter Oilseed Rape. – *Plant Disease*. Vol. 99, No. 5, pp. 667-675.
- Strelkov, S. E., Hwang, S. F., Manolii, V. P., Cao, T. & Feindel, D.** (2016). Emergence of new virulence phenotypes of *Plasmodiophora brassicae* on canola (*Brassica napus*) in Alberta, Canada. – *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 145, pp. 517–529.
- Strelkov, S.E., Tewari, J.P., Smith-Degenhardt, E.** (2006). Characterization of *Plasmodiophorabrassicae* populations from Alberta, Canada. – *Canadian Journal of Plant Pathology*. Vol. 28, No. 3, pp. 467-474.
- Sundelin, T., Christensen, C.B., Larsen, J., Møller, K., Lübeck, M., Bødker, L., Jensen, B.** (2010). In Planta Quantification of *Plasmodiophora brassicae* Using Signature Fatty Acids and Real-Time PCR. – *Plant Disease*. Vol. 94, No. 4, pp. 432-438.

- Syed-Ab-Rahman, S. F., Singh, E., Pieterse, C. Schenk, P.** (2017). Emerging Microbial Biocontrol Strategies for Plant Pathogens. – *Plant Science*. Vol. 267, pp. 102-111.
- Zamani-Noor, N., Rodemann, B.** (2018). Reducing the build-up of *Plasmodiophora brassicae* inoculum by early management of oilseed rape volunteers. – *Plant Pathology*, Vol. 67, pp. 426-432.
- Takahashi, K.** (1994). Influences of Some Environmental Factors on the Viability of Resting Spores of *Plasmodiophora brassicae* Wor. Incubated in Sterile Soil. – *Japanese Journal of Phytopathology*. Vol. 60, No. 6, pp. 658-666.
- Talirapsi kasvatamine.** (2013). /Koost. E. Ilumäe. Eesti Maaviljeluse Instituut. Saku. 98 lk.
- Wallenhammar A.C.** (1998). Observations on yield loss from *Plasmodiophora brassicae* infections in spring oilseed rape. – *Zeitschrift für Pflanzenkrankheit und Pflanzenschutz*. Vol.105, pp. 1–7.
- Wallenhammar A.C.** (2010). Monitoring and control of *Plasmodiophora brassicae* in spring oilseed Brassica crops. – *Acta Horticulturae*. Vol. 867, pp. 181–190.
- Wallenhammar, A. C.** (1996). Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. – *Plant Pathology*, Vol. 45, pp. 710–719.
- Wallenhammar, A.C., Omer, Z.S., Edin, E., Jonsson, A.** (2021). Influence of Soil-Borne Inoculum of *Plasmodiophora brassicae* Measured by qPCR on Disease Severity of Clubroot-Resistant Cultivars of Winter Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). – *Pathogens*. Vol. 10, No. 4, pp. 433.
- Wallenhammar, A.-C.; Almquist, C.; Söderström, M.; Jonsson, A.** (2012). In field distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative real-time PCR. – *Plant Pathology*. Vol. 61, pp. 16–28.
- Wallenhammar, A.C.; Gunnarson, A.; Hansson, F.; Jonsson, A.** (2016). Quantification of *Plasmodiophora brassicae* using a DNA-based soil test facilitates sustainable oilseed rape production. – *Plants*. Vol. 5, No. 2, pp. 21.
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B.M., Thomashow, L.S.** (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. – *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 40, pp. 309–348.
- Woronin, M.** (1878). *Plasmodiophora brassicae*, Urheber der Kohlpflanzen - Hernie. Jahrb Wiss Bot 11:548-574 [translated by Chupp C (1934) *Phytopathological classics* no 4. American Phytopathological Society, St. Paul]
- Yang, J., Kloepper, J.W., Ryu, C.M.** (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. – *Trends in Plant Science*. Vol. 14, pp. 1–4.

EFFECT OF BIOFUNGICIDES ON CLUBROOT DISEASE

SUMMARY

Clubroot of crucifers is a root disease caused by the fungus *Plasmodiophora brassicae*, responsible for causing significant economic damage to cruciferous crops. Clubroot is particularly hard to manage since its resting spores are viable in soil for many years. Current methods to control *P. brassicae* include crop rotation and use of resistant cultivars but cultural practices of the disease are limited.

Biological control methods are being increasingly investigated as a more viable alternative for controlling *P. brassicae* as it reduces pressure of chemical inputs in agriculture. Microbial antagonists are one of the most widespread biological agents currently used in agriculture to control diseases.

The aim of this study was to assess the effect of commercially available biofungicides on the development of clubroot and its potential pathogen suppressive activity. In this study, the biocontrol efficacy of several biofungicides – Mycostop, Prestop and Serenade ASO - against *P. brassicae* were evaluated on oilseed rape in a laboratory experiment. Soil samples already infected with *P. brassicae* were collected from a commercial field in Viljandi County. A pot experiment with six different treatment variants and five replicates at each were established.

The data collected partially supported the original hypothesis. Out of three biofungicides, Prestop was found to reduce *P. brassica* levels in infected soil by more than 90%. The efficacy of Mycostop and Serenade ASO in suppressing *P. brassicae* was insignificant, although application of Serenade ASO reduced disease severity on plants.

The efficacy of biofungicides may have varied due to the different mode of action of the antagonistic microorganisms. The pathogenic inhibitory effect of Prestop (*C. rosea*) may be related to its ability to colonize roots and induce resistance against *P. brassicae*, but the exact mechanisms are not clear. On the other hand, the effectiveness of biofungicides may also have been affected by the very high acidity of the soil, which favors that favour disease development.

Based on the results of this research, it can be concluded that the biofungicide Prestop could be used as part of an integrated disease management program for the control of clubroot. Further studies are required to confirm the biocontrol potential of Prestop against clubroot and for understanding its precise biocontrol mechanisms. In addition, isolation of antagonistic fungal strains from local production fields to detect their biocontrol effects against *P. brassica* might prove an important area for future research.

LISAD

Lisa 1. Tootmispõllu mulla keemilised näitajad

pH KCl	EC	P	K	Mg	Ca	Fe	Zn	Al	Mn
4,48	[μS]	Mehlich mg/100g							
	[mS]								
	43,6	36,95	14,85	21,65	160,58	92,13	0,65	236,31	19,07
		Al mg/100g							
		4,3	4,4	3,4	5,4				

Lisa 2. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Marian Põldmets (sünniaeg 22/05/1990),

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda koostatud lõputöö "Biofungitsiidid ristõieliste nuutri tõrjes", mille juhendaja(d) on Riinu Kiiker, *PhD* ja Kaire Loit, *MSc*
 - 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
 - 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
 - 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemisekskuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor _____

(allkiri)

Tartu, 25.05.2021

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

Riinu Kiiker

(juhendaja nimi ja allkiri)

25.05.2021

(kuupäev)

Kaire Loit

(juhendaja nimi ja allkiri)

25.05.2021

(kuupäev)